ORSAY
Série A
N° D'ORDRE : 206

THÈSE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR-INGENIEUR

PAR

Pierre Milagnawoé KETEVI
INGENIEUR AGRONOME
INGENIEUR ESACG

SENSIBILISATION DU MYOCARDE DE RAT A L'INCORPORATION DE L'ACIDE [14-^{14}C] ERUCIQUE OU DE L'ACIDE [10-^{14}C] OLEIQUE APRES INGESTION D'HUILE DE COLZA

SOUTENUE LE 21 DECEMBRE 1973 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. E. CORABOEUF	PRESIDENT
F. CHEVALLIER	EXAMINATEUR
Mme J. RAULIN	EXAMINATEUR

ORSAY
Série A
N° D'ORDRE : 206

THÈSE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR-INGENIEUR

PAR

Pierre Milagnawoé KETEVI

INGENIEUR AGRONOME
INGENIEUR ESACG

SENSIBILISATION DU MYOCARDE DE RAT A L'INCORPORATION DE L'ACIDE [14-^{14}C] ERUCIQUE OU DE L'ACIDE [10-^{14}C] OLEIQUE APRES INGESTION D'HUILE DE COLZA

SOUTENUE LE 21 DECEMBRE 1973 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. E. CORABOEUF	PRESIDENT
F. CHEVALLIER	EXAMINATEUR
Mme J. RAULIN	EXAMINATEUR

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

SENSIBILISATION DU MYOCARDE DE RAT A L'INCORPORATION DE L'ACIDE {14-^{14}C} ERUCIQUE OU DE L'ACIDE {10-^{14}C} OLEIQUE APRES INGESTION D'HUILE DE COLZA

Pierre Milagnawoé KETEVI

Ingénieur Agronome
Ingénieur ESACG

Equipe de Lipophysiologie - ER 91 du C.N.R.S.
U 56 I.N.S.E.R.M. Hôpital de Bicêtre
94270 - LE KREMLIN-BICETRE

A Nina BRUCE, mon épouse

A ma fille

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542716_0014

A Madame J. RAULIN, Maître de recherches au CNRS, je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance. Elle m'a accueilli au sein de l'Equipe de recherches dont elle est responsable me faisant bénéficier ainsi d'excellentes conditions de travail pour la préparation de cette thèse. Pendant toute la réalisation de ce travail, de l'expérimentation à la rédaction, elle fut pour moi un guide constant. Elle m'a toujours témoigné sa bonté et sa grande générosité. Qu'elle me permette de lui présenter mes très sincères remerciements et mes sentiments de profonde gratitude.

Monsieur le Professeur E. CORABOEUF m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse, je l'en remercie très vivement.

Monsieur le Professeur F. CHEVALLIER m'a accordé sa confiance en assurant la direction de cette thèse. Je lui suis très reconnaissant pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Malgré ses nombreuses occupations, il a bien voulu se charger de la tâche de rapporteur et de faire partie de mon jury. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma gratitude.

Je remercie Monsieur le Professeur D. ALAGILLE de m'avoir permis de réaliser ce travail dans son unité de recherches.

Mes remerciements vont à tous les membres de l'ER 91 du CNRS pour leur souriante et amicale collaboration et pour l'ambiance sympathique dans laquelle j'ai réalisé cette thèse.

Madame D. LAPOUS m'a apporté une aide efficace pour la réalisation expérimentale de ce travail, je lui présente mes chaleureux remerciements.

De tous les membres de l'Equipe de recherches je garde un très bon souvenir.

Que Monsieur R. GARNIER veuille trouver ici mes remerciements pour la partie photographique de ce travail.

Je tiens à remercier tout spécialement Monsieur R. FERON, Directeur Scientifique de la Société ASTRA-CALVE, ainsi que Monsieur P. CARRIERE, Vice-Président de la Fédération de l'Industrie des Corps Gras, de l'aide substantielle qu'ils m'ont accordée et sans laquelle je n'aurais pu envisager l'impression de cette thèse.

A B R E V I A T I O N S

-:-:-:-:-:-:-:-

AS	Activité spécifique
RAS	Radioactivité spécifique
O	Huile d'olive
C	Huile de colza
OL^*	Acide [$10-^{14}C$] oléique
ER^*	Acide [$14-^{14}C$] érucique
$O + OL^*$	Huile d'olive + Acide [$10-^{14}C$] oléique
$O + ER^*$	Huile d'olive + Acide [$14-^{14}C$] érucique
$C + ER^*$	Huile de colza + Acide [$14-^{14}C$] érucique
$C + OL^*$	Huile de colza + Acide [$10-^{14}C$] oléique
DNA	Acide désoxyribonucléique
NA	Noradrénaline

INTRODUCTION

En 1955, THOMASSON (1) cherchant à préciser l'efficacité nutritionnelle d'une vingtaine de matières grasses, constate que l'administration d'huile de colza entraîne une inhibition de la croissance pondérale du rat.

En 1960, les travaux de certains chercheurs finlandais, ROINE, UKSILA, TEIR et RAPOLA (2) indiquent que l'administration au rat ou au porc, de régimes riches en huile de colza (50 à 70 % des calories du régime) provoque rapidement l'apparition d'une myocardite. Par la suite ROCQUELIN et CLUZAN (3) en France, VLES et ABDELLATIF (4) en Hollande, BEARE-ROGERS et coll (5) au Canada, confirment et complètent cette première observation.

I - NATURE DES PHENOMENES OBSERVES

1) Aspects histologiques

En faisant ingérer au jeune rat sevré un régime expérimental contenant de 15 à 25 p.100 en poids (30 à 50 p.100 en valeur calorique) d'huile de colza riche en acide érucique, les auteurs observent dès le premier jour la présence de gouttelettes lipidiques dans le myocarde particulièrement concentrées au niveau des fibres musculaires rouges. Cette accumulation de lipides est portée à son maximum entre le troisième et le septième jour d'expérience. La teneur en lipides totaux du muscle cardiaque du rat atteint

ainsi en une semaine des valeurs trois à quatre fois plus élevées que les proportions habituelles (6) (7). A l'autopsie et par simple observation à l'oeil nu, on découvre un coeur bien plus pâle qu'il n'est coutume (8).

Si l'on poursuit l'expérience, on observe :

- Une régression de la lipidose ;

- L'apparition de lésions des fibres myocardiques et du tissu interstitiel (3) (9). On ignore la durée d'administration minimum qui conduit à ces symptômes mais on sait qu'après 6 mois d'un régime à 15 p.100 d'huile de colza, ils sont irréversibles (Compte-rendu ATP 6 I.N.S.E.R.M., 1973) (10). La fréquence des lésions est plus élevée chez les mâles (80 à 90 p.100 des rats examinés) que chez les femelles (70 p.100) (3). Lorsque l'huile de colza est administrée pendant un court laps de temps (8 jours), puis remplacée par une huile d'arachide, les lésions n'apparaissent pas.

2) Aspects biochimiques

HOUTSMULLER (11) constate au bout de 3 jours que la fraction triglycéride est spécialement accrue (x 10) alors que les acides gras libres augmentent dans une moindre proportion (x 2.4). Selon BEARE-ROGERS et coll (12) la teneur en phospholipides varie ou diminue même légèrement avec le temps.

Les travaux de ROCQUELIN et coll (6) d'une part, et ceux de THOMASSON et coll (13) d'autre part, montrent que lorsqu'on atteint le maximum d'accumulation des lipides dans le myocarde, l'acide érucique représente 25 à 40 p.100 des acides gras totaux, l'acide eicosamonoénoique 7 à 10 p.100. Ensuite, chez le jeune rat et parallèlement à la régression de la stéatose, on observe une diminution lente de la teneur

en acide érucique du myocarde qui n'est pas complètement éliminé même après 39 jours de régime. A ce stade on trouve encore 15 p.100 d'acide érucique dans les lipides cardiaques (12). Chez les rats âgés de 4 semaines en début d'expérience et recevant de l'huile de colza pendant 60 jours (30 p.100 des calories), ROCQUELIN, MARTIN et CLUZAN (14) constatent que l'acide érucique figure encore à raison de 7 à 8 p.100 dans les lipides du coeur.

II - CONDITIONS EXPERIMENTALES D'OBTENTION DU PHENOMENE OBSERVE.

1) Influence de la variété de colza.

Jusqu'à présent la majorité des études biochimiques et physiopathologiques ont été effectuées en testant trois sortes d'huiles* :

- une huile de colza européenne riche en acide érucique (45 à 50 p.100 des acides gras totaux) ;
- une huile de canbra (Canadian Brassica) provenant de graines de colza sélectionnées au Canada pour leur faible teneur (2 à 3 p.100) en acide érucique ;
- une huile "INRA érucique 0" dite huile "primor" provenant de graines sélectionnées en France et pratiquement dénuée d'acide érucique.

L'accumulation très précoce de lipides et les lésions du myocarde ont été mises en évidence de façon indiscutable après administration d'huile de colza. Bien que ROCQUELIN et CLUZAN (3), ROCQUELIN et coll (9) ne décèlent chez le rat âgé de 3 à 13 mois aucune lipidose après avoir distribué de

* Le terme huile de colza s'applique uniquement aux huiles riches en acide érucique.

l'huile de canbra, ils observent néanmoins des lésions du myocarde avec une fréquence cependant plus faible qu'avec l'huile de colza.

Les premiers résultats obtenus sur rats avec l'huile "INRA érucique O", ont montré une lipidose plus importante qu'avec l'huile de canbra raffinée (10).

2) Influence de la dose d'huile du régime

On a cherché à déterminer la dose minimale d'huile au-dessous de laquelle on n'obtient aucune perturbation du myocarde. Le problème est évidemment complexe et la stéatose à court terme peut s'observer dans le myocarde du rat pris au sevrage avec des proportions variées d'huile de colza.

Selon ABDELLATIF et VLES (4) l'accumulation de lipides s'observe encore chez le rat Sprague Dawley qui reçoit 35 p.100 des calories sous forme d'huile de tournesol et 5 p.100 seulement sous forme d'huile de colza (à 45 p.100 d'acide érucique). En utilisant une huile de colza à 29 p.100 d'acide érucique BEARE-ROGERS et coll (12) obtiennent la lipidose du myocarde avec un régime à 40 p.100 de matières grasses dont 20 p.100 des calories sous forme d'huile de colza sur des rats Charles Rivers SPF.

Lorsque l'huile de colza est administrée avec l'huile d'olive et l'huile de carthame, ABDELLATIF et VLES (15) observent les mêmes effets physiopathologiques chez le caneton. Lorsque le régime contient de l'acide érucique sous forme de triérucine, ROCQUELIN et coll (14) ainsi qu'ABDELLATIF et VLES (4,16), observent les mêmes modifications du myocarde.

3) Influence de l'espèce animale et de l'âge

On a cherché à savoir si les différentes espèces animales sont toutes aussi sensibles et si l'âge auquel on

administre l'huile a son importance.

- Le phénomène de stéatose a été étudié chez de nombreuses espèces animales : Rat mâle et femelle de souches différentes, Singe Saïmiri, Porc nain, Porcelet, Gerbille, Caneton, Cobaye et Lapin.

Les essais expérimentaux effectués par BEARE-ROGERS et NERA (17) sur le Singe Saïmiri, le Porc nain, le Porcelet et la Gerbille, montrent qu'au bout d'une semaine d'expérience avec des régimes contenant de l'huile de colza (40 p.100 des calories du régime), on retrouve moins d'acide érucique dans les lipides du muscle cardiaque que chez le rat. Ils signalent en outre une forte accumulation de lipides dans le myocarde de la Gerbille, alors que chez le Porc nain, le Porcelet et le Singe, on constate l'apparition de gouttelettes lipidiques sans que le taux de lipides de l'organe ait augmenté d'une manière significative. Chez le Singe Saïmiri, ils signalent aussi la présence de ces gouttelettes dans le myocarde des animaux témoins. Il y aurait donc chez cette espèce une forte intolérance aux teneurs élevées de matières grasses dans le régime pendant les premiers jours de l'expérience. Au bout de 10 semaines d'expérience, les phénomènes sont différents. Les gouttelettes lipidiques persistent chez les animaux recevant de l'huile de colza, alors qu'elles ont disparu chez les témoins et à l'inverse du rat, on trouve dans le myocarde du Singe plus d'acide érucique (15,6 p.100 des acides gras totaux) qu'après une semaine de régime (4,9 p.100).

Les effets physiopathologiques de l'huile de colza ont été confirmés sur des Lapins nourris pendant 84 semaines à l'aide de régimes contenant en valeur calorique 40 p.100 d'huile de colza ou d'huile de tournesol (18).

Il semble donc que selon les espèces animales étudiées, les réponses soient variables mais qu'elles ne soient jamais nulles.

- Les différents travaux effectués montrent que la stéatose dans le myocarde est très précoce et très importante chez le jeune Rat pris au sevrage et chez le caneton (3,4,5). Chez le Rat de 8 semaines, HOUTSMULLER et coll (11) montrent que le phénomène est encore très marqué. A partir de 12 semaines, BEARE-ROGERS et coll (12) ont constaté avec un régime contenant 40 p.100 en calories d'huile de colza, que l'accumulation de lipides dans le coeur est moins nette que chez le jeune animal. Après 7 jours de régime, l'acide érucique représente 12,2 p.100 des acides gras totaux chez le rat âgé de 12 semaines et 4,5 p.100 chez celui de 32 semaines. Ils n'observent aucune différence entre le rat mâle et le rat femelle.

III - MECANISMES DE LA SURCHARGE LIPIDIQUE

A - GENERALITES

Le métabolisme des lipides par le myocarde a fait l'objet de diverses études qu'il est bon de rappeler.

Depuis les travaux de BING (19), de GORDON et CHERKES (20) et de CARLSTEN et coll (21), on sait que les lipides représentent, à l'état basal, la principale source énergétique du muscle cardiaque bien que tous les lipides ne soient pas utilisés aussi facilement . Ainsi l'utilisation des acides gras estérifiés par le myocarde est encore très controversée. BALLARD et coll (22) notent une captation de cette fraction dans les préparations de coeur perfusé, isolé, chez l'animal. D'après CARLSTEN et coll (21) et WILLEBRANDS (23) le coeur humain extrait du plasma très peu ou pas d'acides gras estérifiés (triglycérides ou phospholipides) par contre il capte mieux les lysolécithines (24,25,26).

1) Extraction des acides gras non estérifiés

Le coeur extrait les acides gras libres du plasma sans dépense d'énergie (27). Cette extraction se fait en fonction :

- de la concentration de l'acide gras dans le sang artériel (28) avec un seuil au-dessous duquel le transfert ne se ferait pas.

- du taux de l'albumine circulante.

- de la longueur de la chaîne hydrocarbonée et du degré d'insaturation de l'acide gras (29,30). Le transport trans-membranaire parait facilité par l'insaturation.

- de la rapidité d'utilisation intracellulaire de l'acide gras (27). Les acides gras s'accumulent dans le myocarde lorsque l'oxydation se fait mal. Par exemple, on peut bloquer in vitro l'oxydation par addition d'acéto-acétate (31) ou par une substitution dans la chaîne (32).

2) Extraction des triglycérides

Le coeur extrait les triglycérides plasmatiques des chylomicrons et des lipoprotéines très légères après hydrolyse par la lipoprotéine-lipase abondante dans le myocarde (33).

[L'activité lipoprotéine-lipase plasmatique augmente d'ailleurs également chez le jeune rat qui reçoit de l'huile de colza (entre le 3ème et le 6ème jour de régime). Cette hausse de l'activité enzymatique provoque une chute rapide de la concentration des triglycérides circulants (84)].

3) Rôle de la carnitine

Après son introduction dans la cellule du myocarde l'acide gras est activé selon la réaction :

$$\text{Acide gras} + \text{CoA} + \text{ATP} \rightleftarrows \text{acyl CoA} + \text{AMP} + \text{PP}$$

Cette activation, catalysée par l'acyl-CoA synthétase, suivie d'une transacylation sur la carnitine (β hydroxy - γ triméthylammonium butyrate) permet à l'acide gras de franchir la membrane mitochondriale. Cette activité enzymatique est élevée et le taux de carnitine important dans le myocarde (34,35,36,37). L'acyl CoA subit donc une transacylation réversible (35,38,39) catalysée par la long-chain-carnitine acyltransférase présente dans le surnageant de la centrifugation à 25 000 g de l'homogénat de coeur de rats.

BREMER (40) montre que les deux substrats, Palmityl CoA et carnitine, fonctionnent comme des inhibiteurs compétitifs vis à vis de l'enzyme. L'excès de palmityl CoA sur la carnitine inhibe l'enzyme. L'addition de carnitine et de CoA à un homogénat de coeur favorise donc la β oxydation du palmitate (41,42). Le défaut de carnitine oriente l'acyl CoA vers l'estérification entraînant une accumulation de triglycérides (43,44).

L'oxydation des lipides ne s'effectue pas toujours activement dans le myocarde. D'où une surcharge lipidique à l'origine vraisemblablement de ce qui s'observe chez l'animal après ingestion d'une dose élevée d'huile de colza. C'est également le cas dans d'autres circonstances :

- l'hypoxie myocardique (45,46)
- les myocardiopathies alcooliques (47,48,49)
- la myocardite diphtérique (50)
- les diabètes alloxaniques (51,52,53).

La stéatose peut se produire également par inhibition de l'activité lipolytique. On sait encore mal comment s'effectue la mobilisation des acides gras dans le myocarde et l'on n'a toujours pas démontré la présence d'une lipase hormonosensible. Mais comme toute augmentation de concentration de

la noradrénaline s'accompagne de celle de l'AMP cyclique (54,55), il est probable que la lipolyse cardiaque fonctionne sur le modèle à double messager.

B - FACTEURS RESPONSABLES DE LA STEATOSE DU MYOCARDE

Lorsque la stéatose du myocarde est provoquée par ingestion d'huile de colza certains arguments ont d'abord suggéré que l'acide érucique pourrait en être seul responsable puisque le symptôme apparaît également après administration de triérucine tout au moins chez le Rat (3,4,15).

Cependant chez le caneton, les lésions sont plus sévères avec l'huile de colza qu'avec la triérucine (16).

En outre l'huile de Canbra pratiquement dénuée d'acide érucique provoque des lésions du myocarde chez le Rat (9). On est ainsi autorisé à envisager d'autres causes à l'origine des perturbations observées à savoir :

- le déséquilibre entre acides gras saturés et insaturés commun aux huiles de colza et de canbra : le rapport acide palmitique/acides insaturés est de l'ordre de 0,05 à 0,08 dans les deux cas, alors qu'il est de 0,17 pour l'huile d'arachide,

- la présence de certains monoènes à longue chaîne (56) ou celle de constituants éventuellement nocifs de l'insaponifiable,

- un trouble dans le métabolisme des acides gras essentiels, localisé au niveau du myocarde (57,58,6), alors qu'il n'est pas constaté dans d'autres organes (59,60,61).

En fait, certaines observations font penser que le myocarde oxyde difficilement certains acides gras et notamment l'acide érucique :

In vitro, les mitochondries ont une activité respiratoire (11) ralentie lorsque le rat a été préalablement traité à l'huile de colza. Les oxydations mitochondriales de l'animal non traité seraient plus faibles in vitro en présence d'érucylcarnitine qu'en présence de palmitylcarnitine (62).

Lors de l'incubation de mitochondries isolées de coeur de rats (n'ayant jamais reçu d'acide érucique) le dégagement de CO_2 radioactif est plus lent (63) si l'on utilise comme substrat l'acide érucique $[14-{}^{14}C]$ à la place de l'acide oléique $[10-{}^{14}C]$. Il se pourrait également (62) que l'acide érucique inhibe l'oxydation mitochondriale des autres acides gras.

Le comportement spécial du myocarde envers l'incorporation de l'acide érucique, son accumulation et son métabolisme ultérieur, procède peut-être de certains constituants encore imprécisés de l'huile de colza. Notre propos n'est en aucune façon d'en aborder l'étude exhaustive. Nous nous sommes demandés : a) si la "sensibilisation" du myocarde à l'accumulation de lipides, dans les jours qui suivent le début de l'ingestion d'huile de colza, se produit ensuite parce qu'on poursuit le traitement et qu'on exagère alors l'administration d'acide érucique, b) si la structure membranaire des cellules du myocarde, acquise à ce stade, se prête tout aussi bien ensuite à l'incorporation et à l'accumulation de n'importe quel acide gras.

Le travail présenté ici rapporte les résultats concernant l'incorporation *in vivo* des acides érucique et oléique marqués dans le myocarde de jeunes rats après qu'on ait distribué quelques jours auparavant soit une huile de colza, soit une huile d'olive. On détermine également :

- la radioactivité des particules subcellulaires du myocarde : noyaux, mitochondries, microsomes et du cytosol, en fonction de la durée d'administration des huiles ;

- l'incorporation de l'acide érucique ou de l'acide oléique marqué dans les lipides du myocarde et dans ceux des mitochondries ;

- et l'on recherche les produits de leur métabolisme dans les lipides radioactifs.

En outre, pour savoir s'il existe une relation entre le métabolisme cardiaque des lipides et l'activité adénylate cyclase nous avons mesuré cette dernière après avoir favorisé la lipidose par ingestion d'huile de colza.

Les observations les plus spectaculaires de ce travail permettent de penser à un conditionnement particulier du myocarde 24 à 48 heures après le commencement du traitement à l'huile de colza.

PROTOCOLE ET

TECHNIQUES EXPERIMENTALES

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Le protocole expérimental est le suivant :

1) On administre par intubation gastrique, et toujours 24 heures avant de sacrifier les rats pris au sevrage, <u>une seule dose d'acide gras radioactif</u> (acide [14-^{14}C] érucique ou acide [10-^{14}C] oléique) en émulsion.

2) L'unique dose d'émulsion radioactive est donnée soit sans complément de lipides (jour 0) soit après ingestion quotidienne de 0,5 ou 1 ml d'huile de colza à 48 p.100 d'acide érucique ou d'huile d'olive témoin administrée par la même voie.

Au moment du sacrifice, on prélève le sang dont on recueille le plasma et le coeur qui est homogénéisé. On détermine leur radioactivité totale et spécifique, rapportée aux protéines.

Le travail est conduit en plusieurs étapes :

I - Une étude de courte durée (3 jours) portant sur :

1) l'incorporation des acides gras marqués homologues des huiles administrées, soit :
- acide érucique avec huile de colza,
- acide oléique avec huile d'olive.

2) l'incorporation des acides gras marqués hétérologues des huiles administrées, soit :
- acide érucique avec huile d'olive,
- acide oléique avec huile de colza.

II - Une étude plus longue (7 jours) rapportée en 2 temps pour simplifier la comparaison avec les expériences précédentes :

a) résultats obtenus dans les 3 premiers jours; b) résultats obtenus du 4ème au 7ème jour. Elle porte sur l'ensemble des lots expérimentés en I, soit :

- acide érucique avec huile de colza,
- acide érucique avec huile d'olive,
- acide oléique avec huile de colza,
- acide oléique avec huile d'olive.

III - Une étude de la radioactivité spécifique des particules subcellulaires effectuée uniquement après incorporation du jour 0 au 3ème jour d'acides gras marqués homologues aux huiles administrées.

IV - Une étude du métabolisme des acides gras marqués par recherche de leurs dérivés radioactifs dans les lipides des homogénats et des mitochondries après 24, 48 et 72 heures d'incorporation d'une seule dose d'émulsion radioactive.

On détermine enfin l'activité adénylate cyclase des homogénats de myocardes prélevés chez des rats auxquels on a administré de l'huile de colza ou de l'huile d'olive pendant 3 jours consécutifs.

T E C H N I Q U E S   E X P E R I M E N T A L E S

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

I ANIMAUX ET REGIMES

II PREPARATION DE L'EMULSION RADIOACTIVE

III MODE D'ADMINISTRATION DES HUILES ET DE L'EMULSION RADIOACTIVE

IV HOMOGENEISATION ET FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

V DOSAGE DES PROTEINES

VI EXTRACTION DES LIPIDES (sérum, coeur, fraction mitochondriale)

VII ANALYSE DES ACIDES GRAS

VIII MESURE DE LA RADIOACTIVITE

IX DETERMINATION DE L'ACTIVITE ADENYLATE CYCLASE

TECHNIQUES EXPERIMENTALES

I - ANIMAUX ET REGIMES

Dans toutes les expériences, dont les résultats sont consignés dans les chapitres suivants, on utilise des rats mâles de souche Wistar CF au sevrage, provenant du Centre d'Elevage R. Janvier, répartis en lots homogènes. Ils reçoivent un régime de base lipidoprive et par sondage gastrique une dose quotidienne de 0,5 ou 1,0 ml d'huile de colza ou d'huile d'olive.

Composition du régime de base

pour 100 g de régime

Caséine	29
Mélange vitaminique	1
Mélange salin (salt mixture NBC W)	5
Sucre	63
Mousse de cellulose	2

On ajoute 15 g d'eau.

Composition du mélange vitaminique

Pour 10 g de mélange vitaminique

Thiamine (B_1)	20 mg
Riboflavine (B_2)	20 mg
Chlorhydrate de pyridoxine (B_6)	20 mg
Cyanocobalamine (B_{12})	12.10^{-3}
Amide nicotinique (PP)	20 mg
α Tocophérol (E)	20 mg
Biotine	0,2 mg
Ménadione bisulfite de sodium (K_3)	5 mg
Axérophtol (A)	50.000 U
Calciférol (D_3)	0,1 mg
Acide pantothénique	40 mg
Acide folique	1 mg
Inositol	200 mg

Complété à 10 g avec de la caséine dévitaminée, délipidée.

Le chlorure de choline (solution à 20 p.100 dans l'eau) est ajouté directement au régime : 0,5 g p.kg de régime.

La caséine utilisée pour le régime de base renferme approximativement 2,7 p.100 de lipides dont 72 mg p.100 d'acide linoléique.

Les besoins en acides gras essentiels estimés à 45 mg par jour et par Rat sont couverts par l'ingestion quotidienne d'huile de colza ou d'huile d'olive.

L'huile de colza raffinée et l'huile d'olive vierge sont fournies par l'ITERG dans le cadre de l'Action Thématique Programmée ATP N° 6 de l'INSERM.

Le tableau I donne leur composition en acides gras.

II - PREPARATION DE L'EMULSION RADIOACTIVE

On transvase dans un tube de 25 ml le contenu d'une ampoule "CEA" renfermant 0,1 mC de [14-^{14}C] acide érucique (AS = 47,15 mC/mMole) ou de [10-^{14}C] acide oléique (AS = 42,5 mC/mMole) en solution dans l'hexane. On évapore l'hexane sous azote et on ajoute 0,3 ml d'huile de colza ou d'huile d'olive. On chauffe légèrement pour dissoudre l'acide marqué dans l'huile puis on ajoute 9,7 ml de Tween/glucose composé de :

Glucose	5 g
Tween 20	1 g
Eau distillée q.s pour 100 ml	

On porte au bain-marie à 75° C, puis on agite pour homogénéiser.

III - MODE D'ADMINISTRATION DES HUILES ET DE L'EMULSION RADIOACTIVE

L'intubation gastrique se fait au moyen d'une sonde droite à bout rond de 20 cm (Néoplex 6-10/5, fournie par PORGES). La sonde en plastique est fixée directement sur une

TABLEAU I

COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES HUILES ADMINISTREES

(p.100 molaires des acides gras totaux)

	C_{16}	$C_{16}:1$	C_{18}	$C_{18}:1$	$C_{18}:2$	$C_{18}:3$	C_{20}	$C_{20}:1$	$C_{22}:1$
Colza raffiné	3,6	traces	1,0	13,7	12,2	9,2	0,5	10,0	48,8
Olive vierge	9,5	0,6	2,7	78,7	7,2	0,4	0,3	0,4	-

seringue à tuberculine de 1 ml (JINTAN-TERUMO disposable syringe). On administre de cette façon 0,5 ou 1 ml d'huile (colza ou olive), ou d'émulsion radioactive.

Après administration de 5 ou 10 µC d'acide gras marqué on lave la seringue avec 1 ml d'émulsion non radioactive qu'on administre ensuite à l'animal. Par ce procédé on s'assure d'une reproductibilité satisfaisante des doses de radioactivité données, d'autant plus qu'on utilise une nouvelle seringue pour chaque animal.

I V - HOMOGENEISATION ET FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

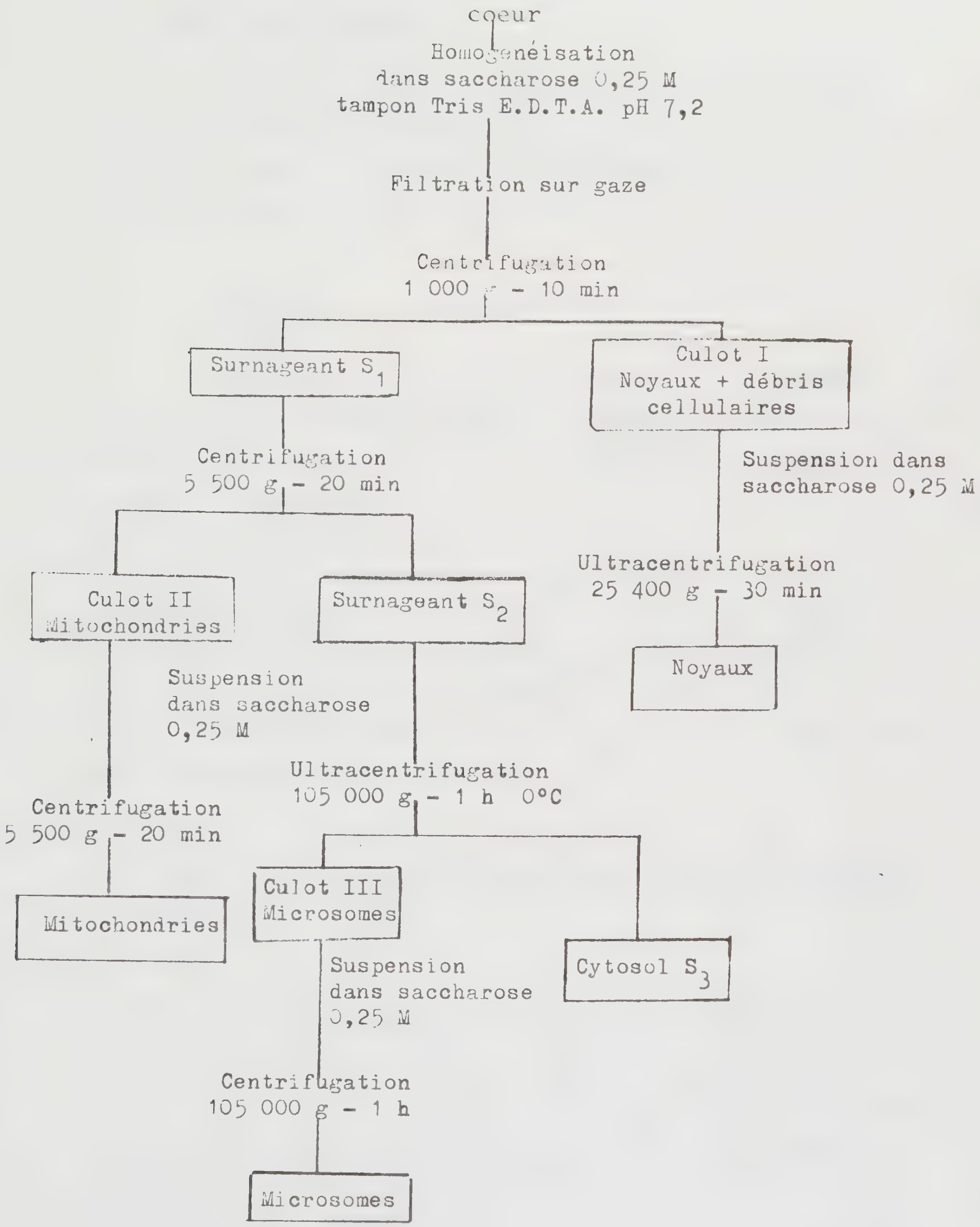
Les rats sont sacrifiés par décapitation. On recueille le sang dont on sépare le sérum par centrifugation à 1 000 g pendant 20 minutes. On prélève les coeurs qui sont ouverts, vidés de leur sang, lavés dans du sérum physiologique NaCl 9 ‰. Ils sont immédiatement pesés et homogénéisés à 0° C à l'aide d'un broyeur à piston de téflon de type Potter dans une solution de saccharose 0,25 M pH 7,2 (tampon Tris 0,02 M-EDTA 0,002 M).

L'homogénat est soit utilisé tel quel, soit fractionné par ultracentrifugation différentielle. Dans ce cas, on le centrifuge à 1 000 g pendant 10 minutes pour obtenir une sédimentation des noyaux. Le surnageant (S_1) est centrifugé à 5 500 g pendant 20 minutes pour obtenir la fraction mitochondriale. Le surnageant (S_2) est centrifugé à 105 000 g pendant une heure pour sédimenter les microsomes. Le surnageant (S_3) de cette dernière centrifugation est constitué du cytosol.

Les sédiments des différentes particules sont purifiés par lavages et recentrifugations successifs remis en suspension dans un volume donné de tampon saccharose (voir plus haut).

Le schéma 1 consigne l'ensemble des opérations au cours du fractionnement.

SCHEMA 1


coeur
Homogénéisation
dans saccharose 0,25 M
tampon Tris E.D.T.A. pH 7,2
Filtration sur gaze
Centrifugation
1 000 g - 10 min
Surnageant S1
Culot I
Noyaux + débris
cellulaires
Centrifugation
5 500 g - 20 min
Suspension dans
saccharose 0,25 M
Ultracentrifugation
25 400 g - 30 min
Culot II
Mitochondries
Surnageant S2
Noyaux
Suspension
dans saccharose
0,25 M
Ultracentrifugation
105 000 g - 1 h 0°C
Centrifugation
5 500 g - 20 min
Culot III
Microsomes
Mitochondries
Cytosol S3
Suspension
dans saccharose
0,25 M
Centrifugation
105 000 g - 1 h
Microsomes

V - DOSAGE DES PROTEINES

Les protéines sont dosées par le biuret dans la première expérience, ensuite selon la méthode de Lowry (64) après traitement par le TCA 5 % et dissolution du précipité dans 2 ml d'une solution de NaOH N.

Principe.

Une association cuivre-protéine réduit un complexe phosphomolybdate-phosphotungstate en donnant une coloration bleue. Si l'on se place entre certaines limites de concentration, la coloration est directement proportionnelle à la quantité de protéines.

La densité optique déterminée à 660 nm est mesurée 30 min après le début de la réaction. La courbe de référence est tracée après dosages étalonnés d'une solution aqueuse de sérumalbumine de boeuf, Fraction V (100 µg/ml).

Dans l'expérience préliminaire, on dose les protéines de l'homogénat par la méthode du biuret

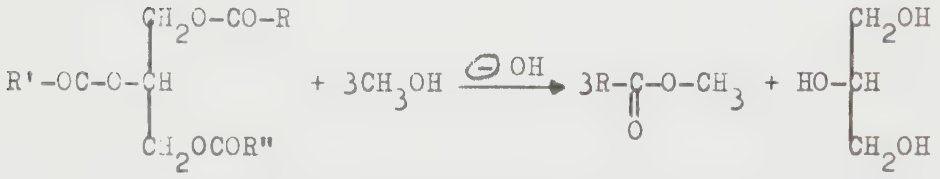
VI- EXTRACTION DES LIPIDES (sérum, coeur, fraction mitochondriale)

Les lipides sont extraits selon la technique de FOLCH, LEES et SLOANE-STANLEY (65) par un mélange chloroforme-méthanol (2/1) glacé utilisé en quantité au moins égale à 20 fois le volume de la suspension. L'extrait brut de lipides totaux est lavé à l'aide du mélange chloroforme-méthanol-eau (8/4/3). On laisse décanter une nuit à la chambre froide et l'on soutire la phase inférieure chloroformique. On évapore le solvant et on reprend les lipides dans une quantité aliquote de pentane ou d'hexane.

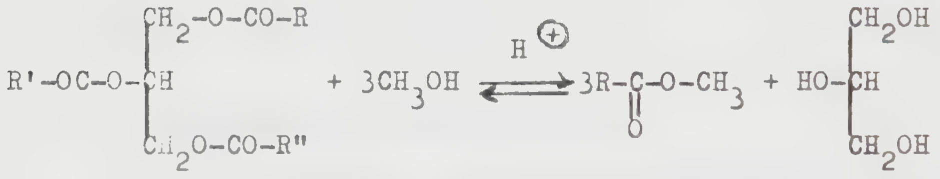
VII - ANALYSE DES ACIDES GRAS

Les acides gras sont transestérifiés par la méthode de LOURY (66). C'est une méthode qui combine successivement l'alcoolyse alcaline et l'estérification acide suivant les réactions globales :

1) Méthanolyse alcaline des triglycérides



2) Méthanolyse acide des triglycérides



Le milieu alcalin (méthylate de sodium) acidifié par addition d'un excès de méthanol chlorhydrique. Par ce procédé on obtient la transformation rapide et pratiquement complète des lipides en esters méthyliques.

Mode opératoire

Les lipides secs sont placés dans un tube et l'on ajoute 0,4 ml de solution de méthylate de sodium (méthanol anhydre à 1 p.100 de sodium) pour 50 mg d'acides gras à trans-estérifier. On porte au bain-marie à 60° C jusqu'à l'obtention

d'une seule phase, puis on ajoute 0,5 ml d'une solution méthanolique à 4 p.100 d'acide chlorhydrique, on porte à l'ébullition pendant 5 min. Après refroidissement, on ajoute de l'eau et on extrait 3 fois les lipides à l'hexane. Pour de très faibles quantités d'esters méthyliques, on n'évapore pas l'acide mais on ajoute après refroidissement une solution aqueuse de Tris 0,3 % et 0,5 ml de n-pentane redistillée. Les esters méthyliques sont séchés sous courant d'azote et repris avec un minimum de solvant.

Analyse des esters méthyliques

1) Séparation des esters méthyliques sur couche mince

Les esters méthyliques sont séparés sur couche mince de gel de silice Merck imprégné de nitrate d'argent suivant la technique de SKIDMORE-ENTENMAN.(67).

2) Composition en acides gras

Les esters méthyliques sont analysés avant ou après séparation sur couche mince en chromatographie gaz-liquide (appareil Girdel 75 FD 1 GIRAVIONS-DORAND) détecteur à ionisation de flamme dans les conditions suivantes :

Colonne 3 m
DEGS 7 % sur Chromosorb W 80/100
Pression d'azote 1 bar
Température d'injection 210° C
Température de la Colonne 190° C

VIII- MESURE DE LA RADIOACTIVITE

La mesure de la radioactivité des homogénats, des fractions subcellulaires et des extraits lipidiques est effectuée au moyen d'un compteur à scintillation liquide

(Intertechnique SL 30). Les solutions chloroformiques de lipides sont évaporées directement dans les fioles de comptage. On dissout les protéines des aliquotes d'homogénat ou de fractions subcellulaires par quelques gouttes d'une solution d'hydroxyde d'hyamine. Dans chaque fiole de comptage on ajoute 10 ml de solution scintillante de Bray comprenant par litre :

Naphtalène	60 g
PPO	4 g
POPOP	200 mg
Méthanol	100 ml
Ethylène glycol	20 ml
Dioxane qs p.	1000 ml

Tous les comptages (10 min) sont effectués en double. Dans le calcul on défalque le bruit de fond estimé sur un blanc et l'on tient compte du rendement et du quenching.

La radioactivité des lipides ou de leurs esters méthyliques séparés sur couche mince est détectée et enregistrée directement au moyen du compteur proportionnel DUNNSCHICHT SCANNER BERTHOLD type LB 2722.(87)

IX - DETERMINATION DE L'ACTIVITE ADENYLATE CYCLASE

Le coeur est prélevé et rincé dans un tampon Tris HCl (0,050 M, pH 7,4) afin d'éliminer le sang, les érythrocytes possédant une activité adénylate cyclase. Pour l'homogénéisation, qui se fait dans une solution de saccharose 0,25 M, on prélève une fraction ventriculaire et on ajuste le volume pour obtenir 300 à 500 µg de protéines dans 25 µl. L'incubation se fait suivant le protocole de CHASE et AURBACH (68), en présence d'un mélange réactionnel constitué par :

- Tris HCl (0,050 M, pH 7,4) contenant un système régénérateur phosphocréatine (10 mM)-phosphocréatine kinase (10 UI/ml) ;
- $MgCl_2$ (5 mM) ;

- Théophylline (10 mM) ;
- Albumine (BSA : 0,015 %) ;
- (α ^{32}P) ATP (20 à 30 cpm/pmole) = 1,23 mM.

Pour mesurer l'activité maximale de l'enzyme, on ajoute NaF (10 mM). Les mesures d'activité basale reçoivent le même volume de tampon.

L'incubation se déroule à 37° C, la réaction étant arrêtée, au bout de 10 mn, par addition d'une solution "diluante". On place ensuite le tout, pendant 3 mn, dans l'eau bouillante.

La solution diluante contient : ATP froid (40 mM), c-AMP froid (12,5 mM) comme entraîneur, ^{3}H-c-AMP (3.10^{5} cpm/ml) comme étalon interne. La séparation du c-AMP s'effectue sur colonne d'alumine, l'élution se faisant par 2 ml de tampon Tris-HCl (0,050 M, pH 7,6). Les protéines sont déterminées par la méthode de Lowry.

R E S U L T A T S

R E S U L T A T S

-:-:-:-:-:-:-:-:-

A - INCORPORATION DES ACIDES GRAS MARQUES AU MYOCARDE

I - ADMINISTRATION D'HUILE ET D'ACIDES GRAS HOMOLOGUES

1) Radioactivité totale et radioactivité spécifique

2) Radioactivité du myocarde rapportée à celle du plasma

II - INCORPORATION DES ACIDES GRAS MARQUES SANS ADMINISTRATION D'HUILE

III - ADMINISTRATION D'HUILE ET D'ACIDES GRAS HOMOLOGUES OU HETEROLOGUES

1) Expérience de 3 jours

2) Expérience de 7 jours

   a) Incorporation des acides gras marqués dans les 3 premiers jours d'administration d'huile

   b) Incorporation des acides gras marqués du 4ème au 7ème jour d'administration d'huile

   c) Relation entre la radioactivité du myocarde et celle du plasma

   d) Poids des coeurs et teneur en DNA

B - INCORPORATION DES ACIDES GRAS MARQUES DANS LES FRACTIONS SUBCELLULAIRES DU MYOCARDE

I - FRACTIONS SUBCELLULAIRES DE LA SERIE C + ER*

II - FRACTIONS SUBCELLULAIRES DE LA SERIE O + OL*

C - METABOLISME DE ER* OU DE OL* AU NIVEAU DU MYOCARDE

I - LIPIDES DE L'HOMOGENAT TOTAL

II - LIPIDES DES MITOCHONDRIES

D - ACTIVITE ADENYLATE CYCLASE

R E S U L T A T S

A - INCORPORATION DES ACIDES GRAS MARQUES AU MYOCARDE

I - ADMINISTRATION D'HUILES ET D'ACIDES GRAS HOMOLOGUES

- Lot O + OL* = huile d'olive + acide [10-^{14}C] oléique
- Lot C + ER* = huile de colza + acide [14-^{14}C] érucique

1) Radioactivité totale et radioactivité spécifique (RAS)

TABLEAU II

Pour simplifier l'interprétation de ces premiers résultats on choisit dans chaque lot les homogénats de myocarde présentant approximativement la même teneur en protéines. Le tableau II et le graphique 1 font état de la radioactivité totale des coeurs 24 h après l'administration de l'acide gras marqué, sans que les rats aient reçu l'huile expérimentale, ou après qu'on leur en ait distribué une dose quotidienne pendant 1, 2 ou 3 jours.

Le dosage direct des protéines sur homogénat total de myocarde donne, de façon générale, des valeurs en excès sur ce qu'on peut obtenir après précipitation par l'acide trichloracétique - l'imprécision venant de la plus ou moins forte quantité de lipides qui perturbent la lecture au spectrophotomètre.

Avant d'interpréter ces résultats il faut souligner que la radioactivité des échantillons est de même ordre de grandeur dans un lot et pour une durée expérimentale donnée

TABLEAU II

RADIOACTIVITE DES HOMOGENATS DE MYOCARDE ET DU PLASMA APRES INGESTION D'HUILE ET 24 H APRES ADMINISTRATION D'ACIDES GRAS MARQUES HOMOLOGUES (10 µC/RAT)

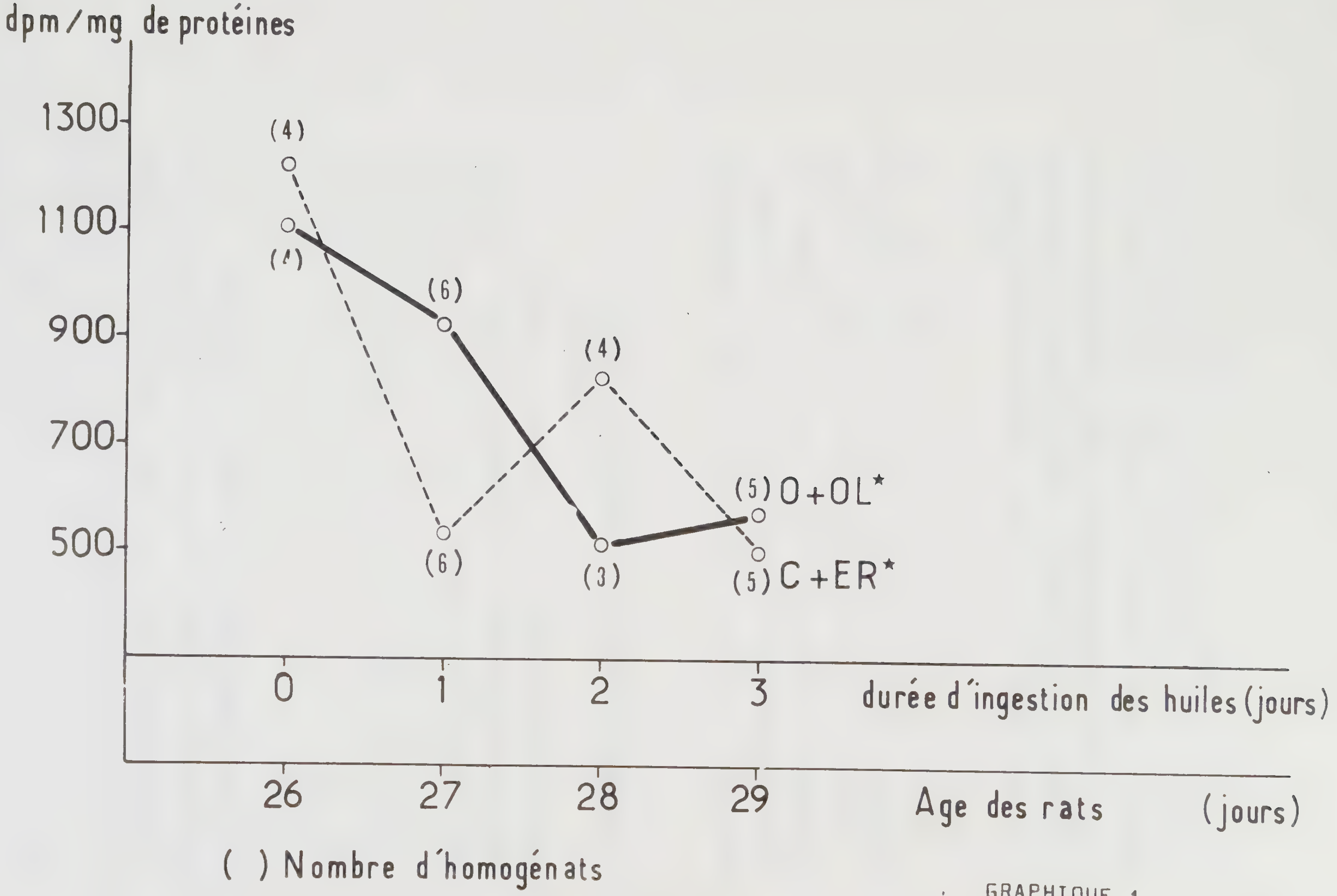
Durée d'administration des huiles (jours)	Age des rats (jours)	Radioactivité du plasma (dpm/100 ul)	Radioactivité de l'homogénat		Radioactivité de l'homogénat / Radioactivité du plasma
			dpm/coeur	dpm/mg de protéines	
O + OL*					
0 (4)	26	13 047	28 825	1 108 ± 84	2,2
1 (6)	27	8 353	27 083	934 ± 95	3,2
2 (3)	28	4 326	14 933	515 ± 56	3,3
3 (5)	29	6 922	17 320	577 ± 96	2,5
C + ER*					
0 (4)	26	11 346	31 937	1 228 ± 102	2,8
1 (6)	27	4 790	15 460	533 ± 65	2,8
2 (4)	28	6 663	24 987	861 ± 73	3,7
3 (5)	29	6 152	15 047	501 ± 93	2,5

O + OL* = Huile d'olive + acide [10-^{14}C] oléique

C + ER* = Huile de colza + acide [14-^{14}C] érucique

( ) Nombre d'échantillons

RADIOACTIVITE SPECIFIQUE des HOMOGENATS de MYOCARDE



GRAPHIQUE 1

mais qu'elle présente des écarts individuels importants comme en témoignent les valeurs des erreurs sur la moyenne. Ces précisions étant données, on constate un comportement spécial du myocarde envers l'acide érucique marqué à une époque qui se situe au cours du second jour de l'administration d'huile de colza (rats de 28 j, 7ème j après le sevrage).

En effet à ce stade la radioactivité atteint un état quasi stationnaire (515 dpm/mg de protéines) dans le myocarde marqué à l'acide oléique alors que l'incorporation de l'acide [14-^{14}C] érucique (ER*) est plus forte (861 dpm/mg de protéines). Le troisième jour d'expérience, l'incorporation de l'acide érucique est réduite et approximativement identique à celle de l'acide [10-^{14}C] oléique (OL*).

2) Radioactivité du myocarde rapportée à celle du plasma

A partir du moment où l'on administre une huile aux animaux, le rapport "radioactivité totale du myocarde/radioactivité de 100 µl de plasma" est identique dans les 2 lots "colza" et "olive". Une exception cependant : le second jour, ce rapport est de 12 p.100 plus élevé lorsque les animaux ont reçu de l'huile de colza.

Les résultats suggèrent un comportement spécial du myocarde envers l'incorporation de l'acide érucique marqué après ingestion d'huile de colza. Cette "sensibilisation" apparente des coeurs peut provenir de multiples facteurs exogènes que nous ne désirons pas aborder ici.

Dans ce qui suit nous nous sommes simplement donnés pour tâche de rechercher si ce comportement particulier du

coeur après traitement de l'animal "colza" a trait à la seule incorporation de l'acide érucique ou si elle se produit avec d'autres acides gras, l'acide oléique par exemple.

D'où l'étude de l'incorporation de l'acide érucique ou de l'acide oléique marqué soit après ingestion d'huile de colza soit après ingestion d'huile d'olive. Pour éviter toute interprétation erronnée des résultats, l'expérience est effectuée d'abord sans aucune administration de matière grasse.

II - INCORPORATION DES ACIDES GRAS MARQUES SANS ADMINISTRATION D'HUILE

L'expérience porte sur 2 fratries de rats réparties dans les lots ER* ou OL*. L'expérience dure 3 jours.

TABLEAU III

On trouve de fortes différences de radioactivité dans une même série (tableau III) entre les 2 fratries. Ces variations entre les radioactivités brutes du myocarde (plus fortes d'ailleurs après ingestion de OL* qu'après ingestion de ER*) correspondent parfois à des différences de poids du coeur.

L'administration de ER* est suivie d'une incorporation de radioactivité différente mais de même ordre quel que soit l'âge des rats : on ne retrouve pas ici l'augmentation des dpm constatée (au cours de l'expérience préliminaire) lorsqu'on administrait ER* avec l'huile de colza. Les résultats de l'incorporation de OL* sont plus dispersés (de 4566 à 23510 dpm/coeur).

Si l'on rapporte la radioactivité aux protéines du myocarde, les variations s'amenuisent en partie. Ces RAS conservent, dans l'ensemble, plus de tenue en ER* qu'en OL*.

TABLEAU III

RADIOACTIVITE DES HOMOGENATS DE MYOCARDE 24 H APRES ADMINISTRATION D'ACIDES GRAS MARQUES (5 µC/RAT) SANS INGESTION D'HUILE

Age des rats (jours)	ACIDE [10 - ^{14}C] OLEIQUE				ACIDE [14 - ^{14}C] ERUCIQUE			
	Poids des rats (g)	Poids des coeurs (mg)	dpm totaux	dpm/mg de protéines	Poids des rats (g)	Poids des coeurs (mg)	dpm totaux	dpm/mg de protéines
(1) 26	63	257	5 527	200	65	270	9 219	327
(2) 26	72	293	12 109	504	72	282	11 110	416
(1) 27	71	277	4 566	262	68	289	6 356	185
(2) 27	78	334	23 510	541	67	284	9 455	252
(1) 28	68	247	6 349	243	72	267	5 813	198
(2) 28	85	327	5 758	236	-	-	-	

( ) FRATRIES

III - ADMINISTRATION D'HUILES ET D'ACIDES GRAS HOMOLOGUES OU HETEROLOGUES

Deux expériences sont conduites successivement. Dans la première qui dure 3 jours on inverse simplement les données de l'expérience précédente : les rats reçoivent soit de l'huile d'olive et de l'acide érucique marqué, soit de l'huile de colza et de l'acide oléique marqué. Dans la deuxième expérience qui dure 7 jours on envisage l'ensemble du problème. On administre donc l'huile d'olive soit avec OL* soit avec avec ER* et l'huile de colza soit avec ER* soit avec OL*.

1) Expérience de 3 jours

- lot O + ER * : huile d'olive et acide $[14-^{14}C]$ érucique
- lot C + OL* : huile de colza et acide $[10-^{14}C]$ oléique.

TABLEAU IV

Les variations individuelles de radioactivité des myocardes sont encore assez fortes (tableau IV). Il apparaît, toutefois, que les rats qui reçoivent l'huile de colza incorporent particulièrement bien l'acide oléique marqué. L'excès de radioactivité des coeurs C + OL* sur celle des coeurs O + ER* passe de 39 p.100 le 2ème jour à 44 p.100 le 3ème jour (graphique 2).

2) Expérience de 7 jours

- lot O + OL* : huile d'olive + acide $[10-^{14}C]$ oléique
- lot O + ER* : huile d'olive + acide $[14-^{14}C]$ érucique
- lot C + OL* : huile de colza + acide $[10-^{14}C]$oléique
- lot C + ER* : huile de colza + acide $[14-^{14}C]$érucique

TABLEAU IV

RADIOACTIVITE DES HOMOGENATS DE MYOCARDE APRES INGESTION D'HUILE ET 24 H APRES ADMINISTRATION D'ACIDES GRAS MARQUES HETEROLOGUES (5 µC/RAT)

Durée d'Administration des Huiles (jours)	Age des Rats (jours)	Poids des Coeurs	dpm totaux	dpm/mg de protéines
O + ER*				
2 (5)	28	192 ± 20	1 721	94,4 ± 12,4
3 (2)	29	256 ± 30	3 200	190,7 ± 12,5
C + OL*				
2 (5)	28	201 ± 30	2 536	131,7 ± 30
3 (5)	29	202 ± 34	4 400	275,2 ± 45

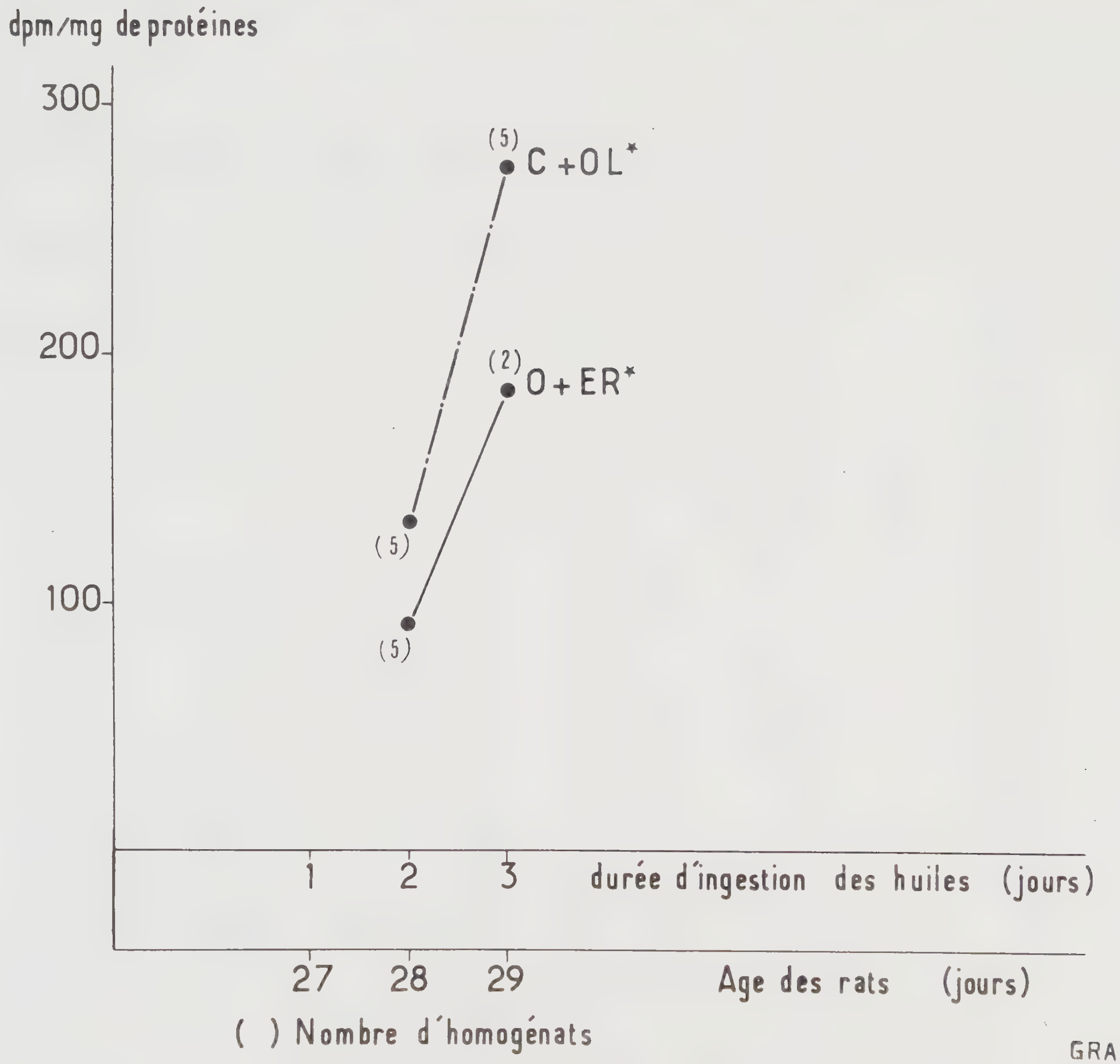
O + ER* = huile d'olive + acide [14-^{14}C] érucique

C + OL* = huile de colza + acide [10-^{14}C] oléique

( ) Nombre d'échantillons.

RADIOACTIVITE SPECIFIQUE des HOMOGENATS de MYOCARDE

24h après administration d'acide gras marqué (5µc)



GRAPHIQUE 2

Pour faciliter l'interprétation des résultats et la comparaison avec les observations antérieures cette expérience sera rapportée en 2 temps :

a) incorporation de la radioactivité dans les 3 premiers jours,

b) incorporation de la radioactivité à partir du 4ème et jusqu'au 7ème jour.

a) Incorporation des acides gras marqués dans les 3 premiers jours d'administration d'huile

TABLEAU V

Les 2 groupes de rats (O = huile d'olive et C = huile de colza) se comportent de façon radicalement différente (tableau V et graphique 3):

1) Le myocarde du groupe O présente rigoureusement la même radioactivité après administration de ER^* ou de OL^* et l'on observe seulement une faible hausse 24 h après le début de l'ingestion d'huile d'olive.

2) Le myocarde du groupe C est nettement plus radioactif que celui du groupe O : rapportée aux protéines, cette radioactivité s'accroît de 2 à 3 fois entre le premier et le second jour d'ingestion d'huile de colza, quel que soit l'acide marqué (ER^* ou OL^*) administré.

On constate donc toujours une certaine "sensibilisation" du myocarde pour l'incorporation de ER^* ou de OL^* dans la journée qui suit le début de l'administration de l'une ou de l'autre huile. Cependant, le phénomène est accentué lorsqu'il s'agit d'huile de colza. Le jour 1 on peut classer les radioactivités spécifiques (ou totales) de ce "pic" suivant l'ordre décroissant : C + ER^*, C + OL^*, O + ER^*, O + OL^*.

L'importance de l'incorporation d'un acide gras marqué n'est donc pas la même suivant que le myocarde du rat provient d'un animal qui a reçu de l'huile d'olive ou de l'huile de colza.

TABLEAU V

RADIOACTIVITE DES HOMOGENATS DE MYOCARDE APRES INGESTION D'HUILE ET 24 H APRES ADMINISTRATION D'ACIDES GRAS MARQUES HOMOLOGUES ET HETEROLOGUES (10 µC/RAT)

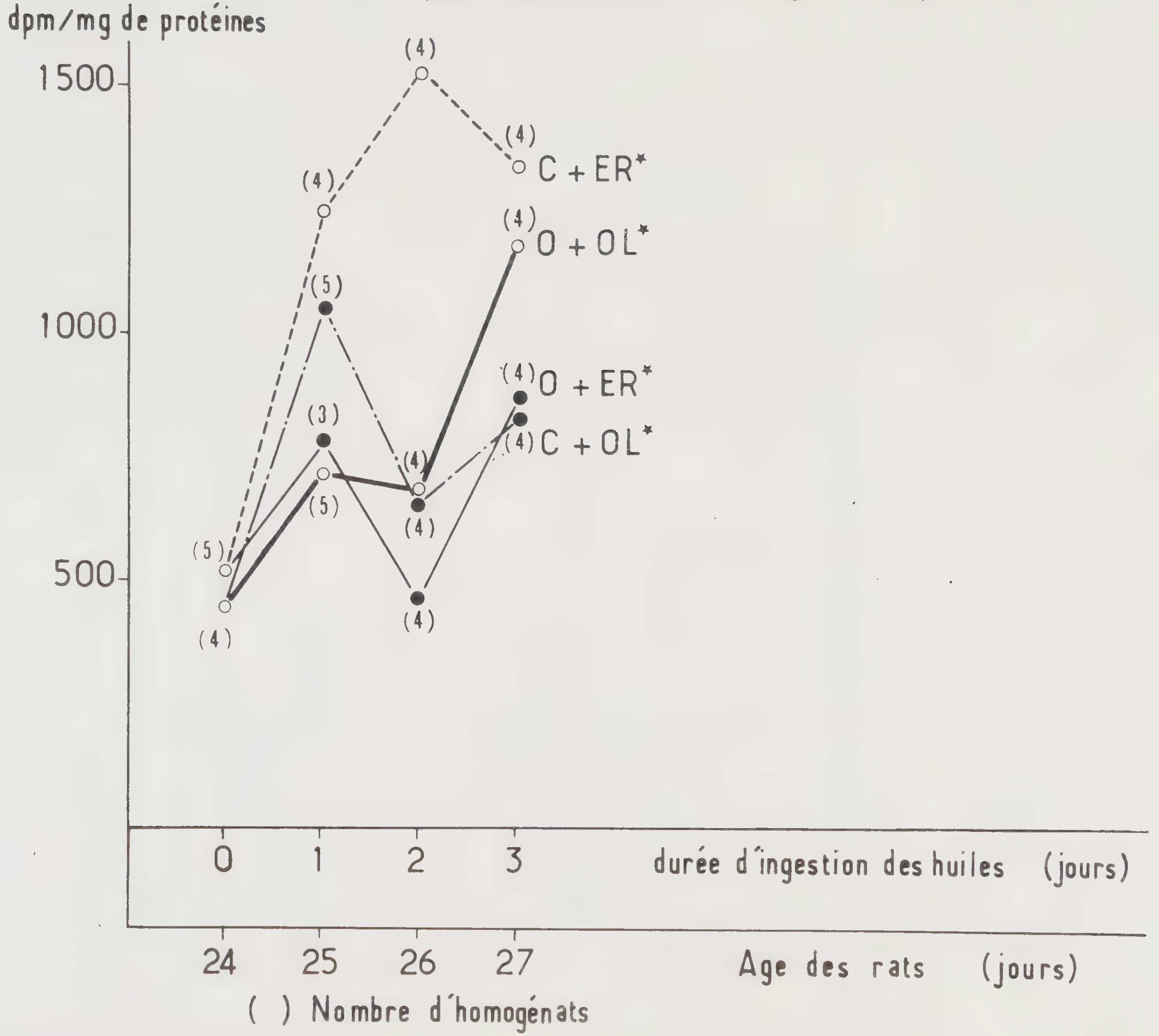
Durée d'administration des huiles (jours)	Moyenne poids des coeurs (mg)	RADIOACTIVITE dpm totaux	RADIOACTIVITE dpm/mg de protéines	Age des rats (jours)	Durée d'administration de l'huile (jours)	Moyenne poids des coeurs (mg)	RADIOACTIVITE dpm totaux	RADIOACTIVITE dpm/mg de protéines
O + OL*					C + OL*			
0 (4)	185 ± 21	7 217	449 ± 90	24	0 (4)	185 ± 21	7 217	449 ± 90
1 (5)	185 ± 15	11 840	716 ± 338	25	1 (5)	193 ± 2	17 702	1 049 ± 380
2 (4)	188 ± 7	12 608	690 ± 168	26	2 (4)	180 ± 13	10 886	671 ± 190
3 (4)	182 ± 40	15 990	1 185 ± 530	27	3 (4)	206 ± 11	14 740	846 ± 103
O + ER*					C + ER*			
0 (5)	178 ± 17	8 529	512 ± 102	24	0 (5)	178 ± 17	8 529	512 ± 102
1 (3)	182 ± 15	12 848	797 ± 206	25	1 (4)	177 ± 8	22 638	1 250 ± 201
2 (4)	187 ± 15	3 948	464 ± 70	26	2 (4)	177 ± 12	26 699	1 525 ± 255
3 (4)	186 ± 20	13 406	860 ± 175	27	3 (4)	205 ± 10	26 026	1 346 ± 381

( ) Nombre **d'échantillons.**

O + OL* = huile d'olive + acide [10-^{14}C] oléique
O + ER* = huile d'olive + acide [14-^{14}C] érucique
C + ER* = huile de colza + acide [14-^{14}C] érucique
C + OL* = huile de colza + acide [10-^{14}C] oléique

RADIOACTIVITE SPECIFIQUE des HOMOGENATS de MYOCARDE

24h après administration d'acide gras marqué (10 µc)



GRAPHIQUE 3

La difference entre les radioactivités spécifiques de ces 2 groupes, toujours en faveur des animaux "colza", est de 47 p.100 le premier jour si l'on administre de l'acide oléique marqué. S'il s'agit d'acide érucique marqué la différence passe de 58 p.100 le jour 1 à plus de 200 p.100 le deuxième jour. Le troisième jour, les RAS des myocardes C + OL* et O + ER* sont approximativement identiques (846 et 860) et relativement faibles, celles des myocardes C + ER* et O + OL* sont de 50 p.100 supérieures.

b) <u>Incorporation des acides gras marqués à partir du 4ème et jusqu'au 7ème jour d'administration d'huile</u>

Le troisième jour d'administration d'huile est une période de transition : à partir de ce stade, les résultats s'inversent (tableau VI et graphique 4). Les RAS des homogénats des lots C + ER* et O + OL* augmentent relativement peu et ne présentent aucune différence significative jusqu'au 7ème jour ; celles des lots C + OL* et surtout O + ER* augmentent considérablement pendant la même période.

TABLEAU VI ET

GRAPHIQUE 4

Il se passe donc le même phénomène qu'au début de l'expérience : l'incorporation de la radioactivité OL* ou ER* ne s'effectue pas avec la même ampleur suivant qu'on administre au préalable une huile d'olive ou une huile de colza. Toutefois, les résultats obtenus à partir du 4ème jour sont inversés par rapport à ce qu'on observait du premier au 3ème jour.

Dès le 4ème jour :

- la RAS obtenue après administration de OL* est 2 fois plus forte dans les myocardes "colza" que dans les myocardes "olive" ;

TABLEAU VI

RADIOACTIVITE DES HOMOGENATS DE MYOCARDE APRES INGESTION D'HUILE ET 24 H APRES ADMINISTRATION D'ACIDES GRAS MARQUES HOMOLOGUES ET HETEROLOGUES (10 µC/RAT)

Durée d'administration des huiles (jours)	Moyenne poids des coeurs (mg)	RADIOACTIVITE dpm totaux	RADIOACTIVITE dpm/mg de protéines	Age des rats (jours)	Durée d'administration de l'huile (jours)	Moyenne poids des coeurs (mg)	RADIOACTIVITE dpm totaux	RADIOACTIVITE dpm/mg de protéines
O + OL*					C + OL*			
3 (4)	182 ± 40	15 990	1 185 ± 530	27	3 (4)	206 ± 11	14 740	846 ± 103
4 (4)	228 ± 15	20 415	1 106 ± 201	28	4 (4)	211 ± 12	43 612	2 415 ± 693
5 (4)	200 ± 10	20 539	1 405 ± 273	29	5 (4)	210 ± 2	38 861	2 667 ± 599
7 (4)	218 ± 17	29 517	2 011 ± 408	31	7 (4)	227 ± 9	40 030	2 763 ± 640
O + ER*					C + ER*			
3 (4)	186 ± 20	13 406	860 ± 90	27	3 (4)	205 ± 10	26 026	1 346 ± 381
4 (5)	190 ± 7	96 607	4 675 ± 602	28	4 (4)	294 ± 14	21 403	1 365 ± 433
5 (4)	204 ± 18	55 404	3 284 ± 560	29	5 (4)	203 ± 20	38 422	1 735 ± 319
7 (3)	213 ± 9	87 106	4 470 ± 320	31	7 (4)	212 ± 12	36 230	1 804 ± 389

( ) Nombre **d'échantillons.**

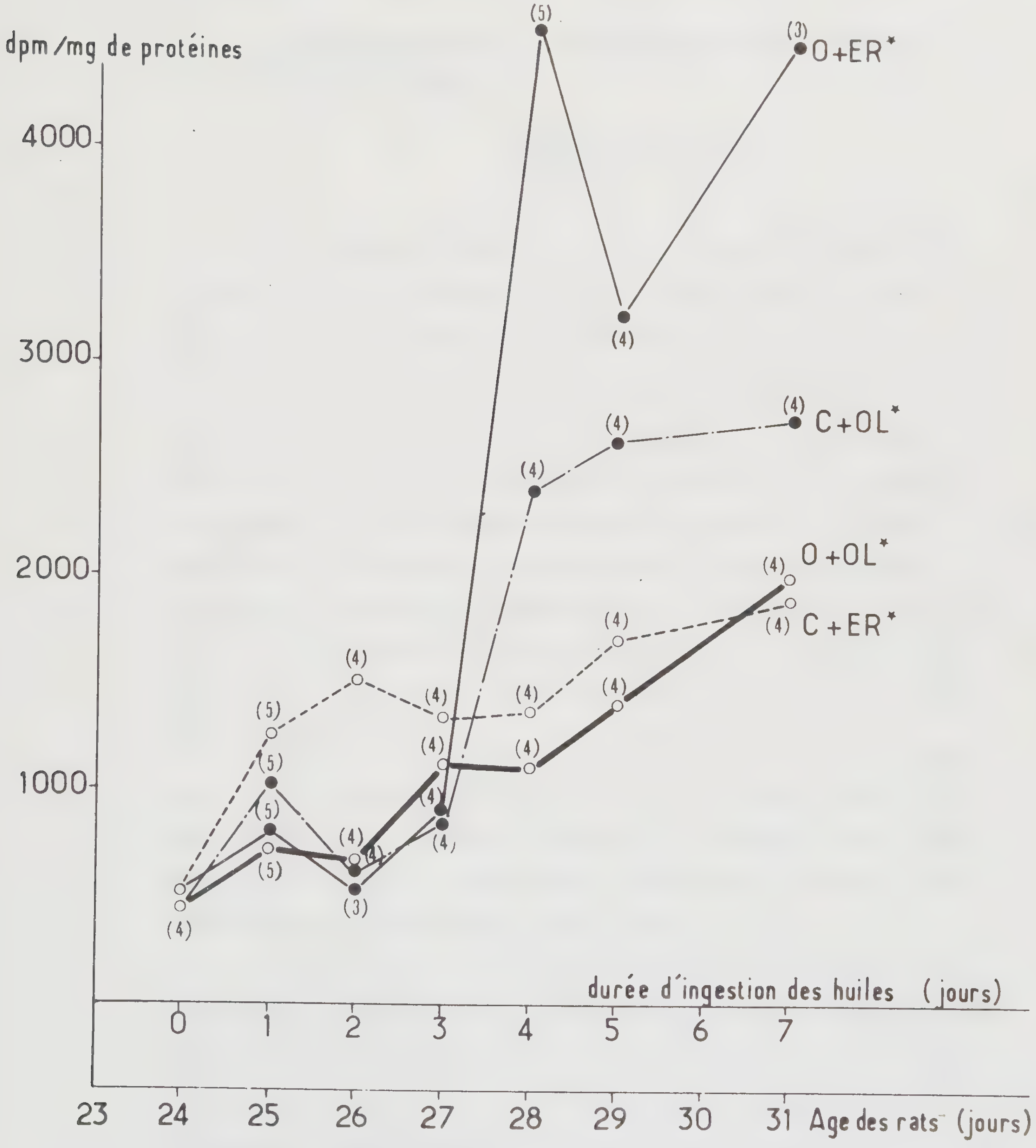
O + OL* = huile d'olive + acide [10-^{14}C] oléique

O + ER* = huile d'olive + acide [14-^{14}C] érucique

C + ER* = huile de colza + acide [14-^{14}C] érucique

C + OL* = huile de colza + acide [10-^{14}C] oléique

RADIOACTIVITE SPECIFIQUE des HOMOGENATS de MYOCARDE
24h après administration d'acide gras marqué (10 µc)



( ) Nombre d'homogénats

GRAPHIQUE 4

- la RAS obtenue après administration de ER* est 3 fois plus forte dans les myocardes "olive" que dans les myocardes "colza".

c) <u>Relation entre la radioactivité du myocarde et celle du plasma</u>

TABLEAU VII ET
GRAPHIQUES 5 et 6

La radioactivité de 100 µl de plasma (tableau VII) s'accroît dans l'ensemble avec la durée d'ingestion des huiles. C'est une constatation surprenante étant donné qu'on distribue à tous les animaux la même dose traceuse (10 µC) de radioactivité ER* ou OL* 24 heures avant la récolte des échantillons de sang. En outre, comme l'expérience se poursuit pendant 8 jours consécutifs, le volume de plasma circulant augmente chez ces animaux en pleine croissance. Les valeurs trouvées pour 100 µl sont donc certainement erronées et gagneraient, si nous en avions les moyens, à être pondérées par un facteur de dilution variable suivant les lots "colza" ou "olive" et suivant la durée de l'expérience.

Comme nos conditions expérimentales ne nous permettent pas d'effectuer ce calcul, nous nous contenterons de remarquer que la pente des courbes qui figurent l'évolution de la radioactivité plasmatique (graphique 5) pourrait être encore plus accentuée dans les 4 lots.

Quoi qu'il en soit, le graphique 5 reproduit à s'y méprendre le graphique précédent qui traduit la RAS des homogénats de myocarde (en dpm/mg de protéines) au cours de la même expérience. On trouve donc une relation quasi directe entre la RAS du myocarde et la radioactivité de 100 µl de plasma. La forte radioactivité des premiers jours dans le lot

TABLEAU VII

RELATION ENTRE LES RADIOACTIVITES DU MYOCARDE ET DU PLASMA.

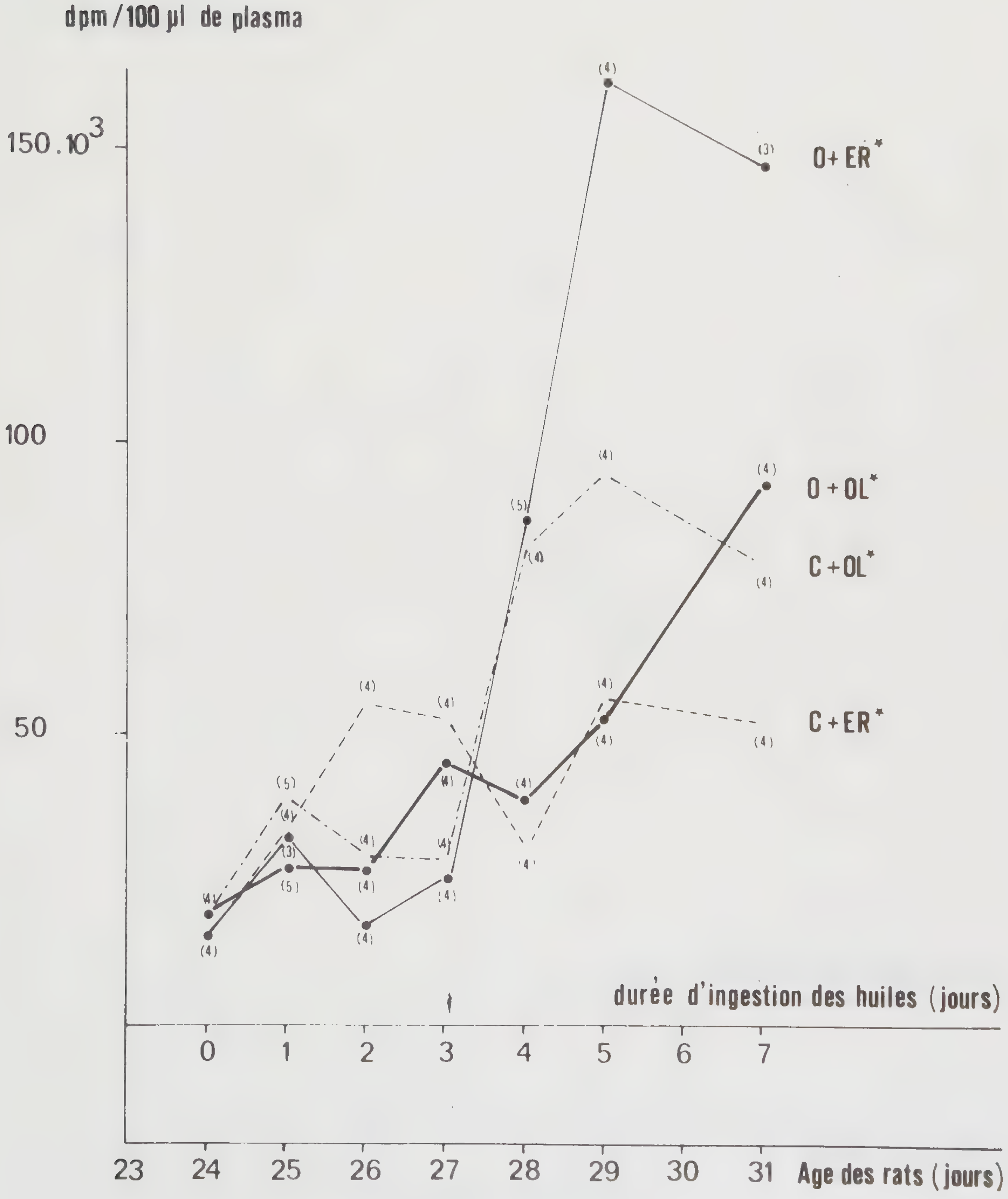
Durée d'administration des huiles (jours)	C + ER*		O + ER*		O + OL*		C + OL*	
	MYOCARDE dpm/mg Frais	PLASMA dpm/100 µl	MYOCARDE dpm/mg	PLASMA dpm/100 µl	MYOCARDE dpm/mg	PLASMA dpm/100 µl	MYOCARDE dpm/mg	PLASMA dpm/100 µl
0	4[illegible] (4)	14 936	48 (5)	14 936	40 (4)	18 412	40 (4)	18 412
1	128 (4)	32 715	71 (3)	31 099	65 (5)	27 351	91 (5)	37 960
2	150 (4)	55 637	49 (4)	16 781	68 (4)	26 417	60 (4)	27 073
3	124 (4)	52 248	75 (4)	24 029	92 (4)	44 904	72 (4)	28 617
4	114 (4)	30 613	398 (5)	86 070	90 (4)	37 751	222 (4)	84 209
5	184 (4)	55 639	266 (4)	161 388	102 (4)	54 798	190 (4)	94 967
7	159 (4)	51 578	393 (3)	146 188	138 (4)	92 859	185 (4)	79 592

( ) Nombre **d'échantillons.**

O + OL* = huile d'olive + acide [10-^{14}C] oléique
O + ER* = huile d'olive + acide [14-^{14}C] érucique
C + OI* = huile de colza + acide [14-^{14}C] oléique
C + ER* = huile de colza + acide [10-^{14}C] érucique

RADIOACTIVITE DU PLASMA

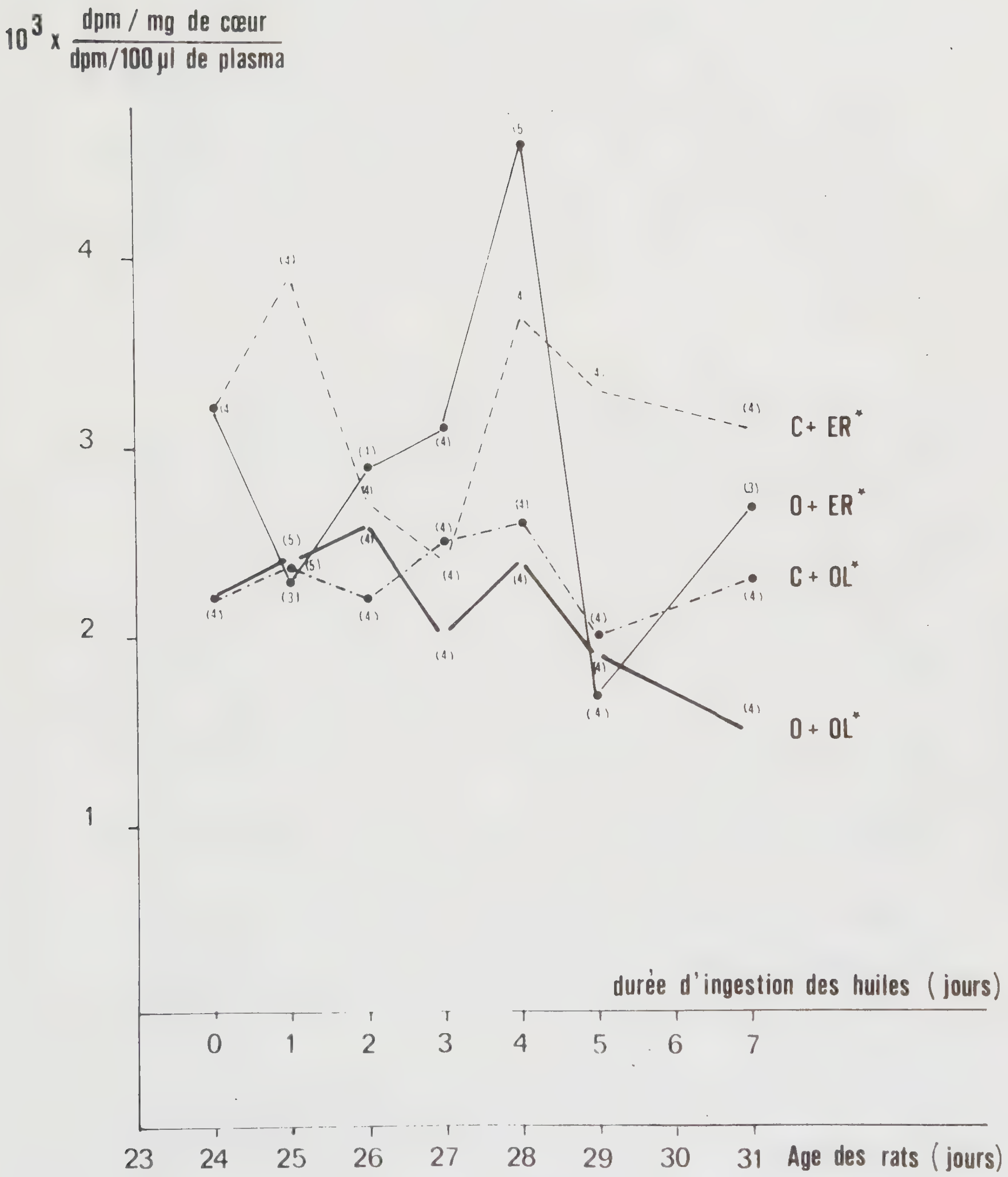
24 h après administration d'acide gras marqué (10 µc)



( ) : Nombre d'échantillons

GRAPHIQUE 5

RELATION ENTRE LES RADIOACTIVITES DU CŒUR ET DU PLASMA
24 h après administration d'acide gras marqué (10 µc)



( ): Nombre d'échantillons

GRAPHIQUE 6

C + ER*, relativement aux autres séries, reste à peu près stationnaire au delà du 3ème jour. Dans les autres lots, la radioactivité augmente à partir du 4ème jour, le lot O + ER* devenant de loin le plus radioactif, puis le lot C + OL* et enfin O + OL*. Ce parallèle entre les RAS du coeur et du plasma tout au long de l'expérience autorise à penser que le comportement du muscle cardiaque est peu éloigné sinon identique à celui des autres organes en ce qui concerne le métabolisme de ER* ou de OL*, mais qu'il est fonction du conditionnement biochimique de l'animal.

Si au lieu de comparer, comme nous venons de le faire, la RAS du myocarde et celle du plasma on calcule la valeur du rapport "radioactivité du coeur (en dpm.10^3/mg frais)/radioactivité de 100 µl de plasma" -en utilisant les données du tableau VII- on constate en outre (graphique 6) :

1) un écart important (3,2 contre 2,2) entre les valeurs trouvées suivant qu'on administre 10 µC de ER* ou 10 µC de OL* - sans aucune adjonction d'huile (jour 0) ;

2) des valeurs faibles et assez voisines jusqu'au 5ème jour dans les lots C + OL* et O + OL* où le quotient se tient aux alentours de 1,7 à 2,2 - valeurs trouvées également le premier et le 5ème jour dans le lot O + ER* ;

3) un tracé biphasique du graphique 6 dans le lot C + ER* : le premier pic (3,9) se produit un jour après le début de l'ingestion d'huile de colza, le second (3,8) a lieu le 4ème jour ;

4) un seul pic abrupt (4,6) le 4ème jour d'ingestion d'huile d'olive dans le lot O + ER* ;

5) le 7ème jour enfin, les valeurs des quotients s'échelonnent par ordre décroissant : C + ER*, O + ER*, C + OL* et O + OL* soit : 3,1 ; 2,7 ; 2,3 et 1,5.

Nous ne nous hasarderons pas, pour le moment, à chercher une interprétation à ces nouveaux résultats qui tendent à faire penser que le coeur réagit jusqu'au 5ème jour de la même façon vis à vis de OL* mais différemment vis à vis de ER* suivant que l'animal reçoit de l'huile d'olive ou de l'huile de colza.

En effet, le phénomène à élucider concerne une lipidose cardiaque favorisée par l'huile de colza. Nous n'avons pas déterminé l'importance de la surcharge lipidique des coeurs "colza" mais elle existe, à en juger par leur couleur pâle. C'est la raison qui nous a conduits à doser les protéines des homogénats avant d'interpréter les résultats de nos expériences. Les rapports établis à partir des données du tableau VII donnent pourtant quelques indications fructueuses pour une recherche ultérieure.

Quel que soit le mode d'expression des résultats, il apparaît toujours une phase de transition qui se situe vers le 3ème jour après le sevrage des animaux - et qui correspond peut-être à une période particulière au cours du développement du coeur. Avant comme après ce jour, le myocarde réagit diversement à l'incorporation des acides gras marqués selon l'huile administrée. En fin de semaine, on peut croire à une adaptation du myocarde au traitement nutritionnel : forte proportion d'acides gras à longue chaîne en C, absence pratiquement complète de ces acides gras "atypiques" en O. Si l'on tient compte des indications du graphique 6 à ce stade, le métabolisme de ER* s'effectue moins rapidement que celui de OL* et pour les 2 acides gras marqués le conditionnement de 7 jours à l'huile de colza paraît encore ralentir le processus.

d) <u>Poids des coeurs et teneur en DNA</u>

L'augmentation de poids des coeurs est à peu près la même dans toutes les séries de rats (tableaux III, IV, V et VI). Cependant, et uniquement dans cette dernière expérience, le 3ème jour d'administration d'huile de colza, les coeurs sont plus lourds que lorsqu'on donne de l'huile d'olive (différence de 11 et 12 p.100). Ce phénomène ne se renouvelle pas au-delà. On peut croire qu'il s'agit alors d'un afflux de cellules migratrices, phénomène non invraisemblable si l'on se réfère à la teneur en DNA du myocarde.

TABLEAU VIII

Le dosage de la teneur en DNA des coeurs dont les résultats figurent au tableau VIII a été effectué pendant une expérience préliminaire au cours de laquelle on distribuait aux rats une dose quotidienne de 0,5 ml d'huile (contre 1 ml dans notre dernière expérience). Un jour après le début de l'ingestion d'huile la teneur en DNA des coeurs "colza" est plus forte que celle des coeurs "olive" ; cette différence s'accentue le second jour et paraît régresser ensuite.

TABLEAU VIII

TENEUR EN DNA TOTAL DES HOMOGENATS DE COEURS (µg)
APRES INGESTION D'HUILE

Durée d'administration des huiles (jours)	Age des rats (jours)	Huile administrée (0,5 ml/jour)		Δ%
		OLIVE	COLZA	
0	26	380 (3) ± 20	380 (5) ± 15	-
1	27	285 (6) ± 46	409 (6) ± 28	43
2	28	309 (3) ± 13	458 (5) ± 33	48
3	29	270 (5) ± 30	360 (4) ± 12	33

( ) Nombre d'échantillons.

B - INCORPORATION DES ACIDES GRAS MARQUES AUX FRACTIONS SUBCELLULAIRES DU MYOCARDE

Les fractions subcellulaires du myocarde ont été préparées après avoir administré 0,5 ml d'huile de colza ou d'huile d'olive pendant 0, 1, 2 ou 3 jours. Les rats reçoivent une dose unique de 10 µC de ER* ou de OL* 24 heures avant leur sacrifice. L'étude porte donc sur 2 séries de rats : C + ER* et O + OL*.

TABLEAU IX

Les différences importantes constatées (tableau IX) entre les RAS des noyaux, mitochondries et microsomes (surtout dans le lot C + ER*) indiquent la faible contamination des particules subcellulaires les unes par les autres au cours de leur préparation. L'examen des mitochondries en microscopie électronique confirme ce point de vue (figure 1). En règle générale, les RAS sont plus fortes dans la série C + ER* que dans l'autre série (à une exception près), l'acide gras marqué étant ou non administré après ingestion d'huile.

1) Fractions subcellulaires de la série C + ER*

Le jour O, les RAS s'étagent par ordre décroissant : microsomes, mitochondries, cytosol, noyaux. Il en est encore ainsi le premier jour d'administration d'huile de colza, bien que toutes les RAS s'infléchissent. Le second jour l'ensemble des RAS remontent et à partir de ce stade les mitochondries deviennent, de loin, les plus radioactives. Le jour 3, la RAS reste forte dans les mitochondries, le cytosol, les noyaux, elle baisse nettement dans les microsomes.

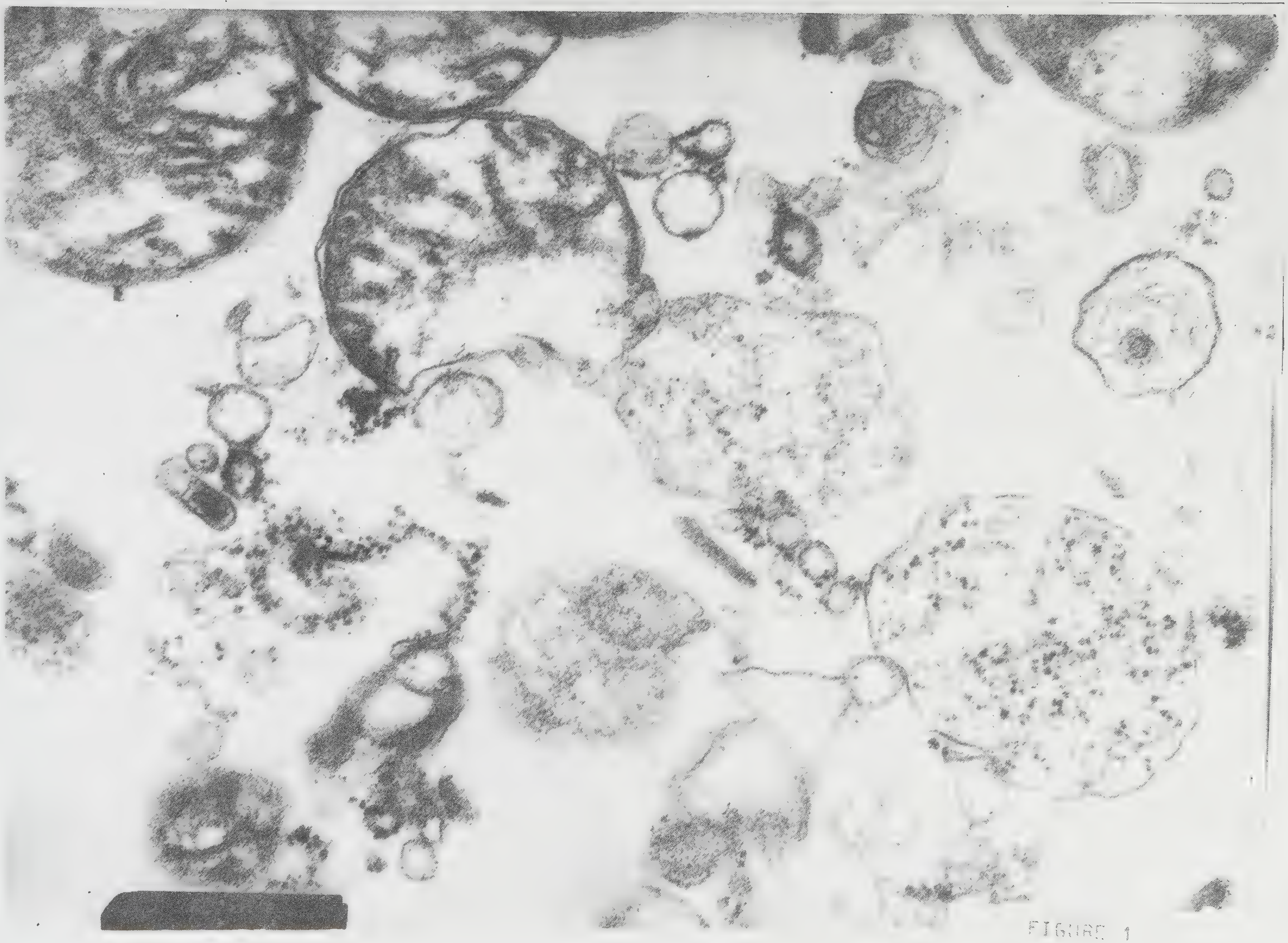


FIGURE 1

TABLEAU IX

RADIOACTIVITE SPECIFIQUE DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES DU MYOCARDE APRES INGESTION D'HUILE ET 24 H APRES ADMINISTRATION D'ACIDES GRAS MARQUES HOMOLOGUES (10 µC/RAT)

Durée d'administration des huiles (jours)	Noyaux	Mitochondries	Microsomes	Cytosol	$\frac{\text{Cytosol}}{\text{100 ul Plasma}} \times 100$
O + OL*					
0	(4) 685 ± 213	(4) 1 312 ± 300	(4) 1 568 ± 465	(4) 1 217 ± 312	9
1	(6) 677 ± 35	(6) 1 322 ± 259	(6) 1 311 ± 249	(6) 1 333 ± 202	16
2	(3) 490 ± 112	(3) 640 ± 173	(3) 940 ± 275	(3) 901 ± 198	21
3	(5) 774 ± 189	(3) 894 ± 143	(3) 1 603 ± 540	(5) 1 158 ± 257	16
C + ER*					
0	(5) 1 004 ± 208	(5) 1 883 ± 560	(5) 2 209 ± 668	(5) 1 447 ± 303	13
1	(6) 854 ± 249	(5) 1 753 ± 575	(6) 1 930 ± 325	(6) 1 013 ± 184	21
2	(5) 1 298 ± 507	(4) 3 535 ± 620	(5) 2 188 ± 380	(5) 2 213 ± 267	32
3	(6) 1 211 ± 302	(5) 2 960 ± 740	(6) 1 235 ± 256	(6) 1 867 ± 504	30

( ) Nombre d'échantillons.

O + OL* = huile d'olive + acide [10-^{14}C] oléique

C + ER* = huile de colza + acide [14-^{14}C] érucique

2) Fractions subcellulaires de la série O + OL*

LesRAS des différentes fractions subcellulaires sont plus proches dans le lot O + OL* que dans le lot C + ER*. Le deuxième jour, on observe un point d'inflexion de 30 à 50 % dans toutes les fractions, la RAS des mitochondries étant la plus diminuée. Le troisième jour, on constate une remontée très nette des RAS qui dépassent alors leurs valeurs de départ dans les noyaux et les microsomes.

En bref on observe :

- une diminution des RAS qui se situe le premier jour dans les fractions C + ER*, le deuxième jour dans les fractions O + OL*,

- le jour 2, la RAS des mitochondries O + OL* est à son minimum alors qu'elle atteint justement à ce stade un maximum dans le lot C + ER*,

- les microsomes sont toujours aussi radioactifs et parfois même plus radioactifs que les mitochondries,

- la RAS du cytosol rejoint parfois celle des microsomes et c'est notamment le cas si l'animal a reçu de l'huile de colza.

Si l'on rapporte la RAS du cytosol à celle du plasma (dernière colonne du tableau IX) pour éliminer les facteurs individuels provenant d'une différence éventuelle de radioactivité injectée, on s'aperçoit que, loin de disparaître, la différence entre la forte RAS des cytosols C + ER* et la faible RAS des cytosols O + OL* s'accentue encore - et tout particulièrement les 2ème et 3ème jours d'administration des huiles.

C - METABOLISME DE ER* ET DE OL* AU NIVEAU DU MYOCARDE

I) Lipides de l'homogénat total

Figure 2

La figure 2 reproduit un enregistrement potentiométrique de la radioactivité des esters méthyliques des lipides du myocarde, comparée à celle des lipides du sérum, 24 heures après l'administration de ER* ou de OL* donné en émulsion par intubation gastrique.

A ce stade et dans le lot OL*, le "radioscanning" inscrit un seul pic au niveau de l'oléique dans les lipides du sérum. Dans le coeur, on trouve également le pic de l'oléique (74 %) mais on observe aussi une certaine radioactivité dans les produits de son métabolisme : monoènes en C20 (20 %) et acides gras saturés (5 %). Dans le lot ER* plus de la moitié de l'acide érucique est converti en acide oléique et leurs 2 pics sont enregistrés par radioscanning des lipides du myocarde et du sérum.

TABLEAU X

48 heures après administration de OL*, la radioactivité de l'acide oléique du coeur est moins forte que le premier jour, celle des autres acides gras augmente. Le métabolisme de ER* s'effectue, semble-t-il, moins vite le 2ème jour que dans les premières 24 heures puisque le rapport des radioactivités érucique/oléique est approximativement le même qu'auparavant (tableau X).

II) Lipides des mitochondries

Figure 3

ENREGISTREMENT de la RADIOACTIVITÉ des ESTERS MÉTHYLIQUES

(Dünnschicht Scanner II BERTHOLD LB 2722)

Plaques de gel de Silice+$AgNO_3$

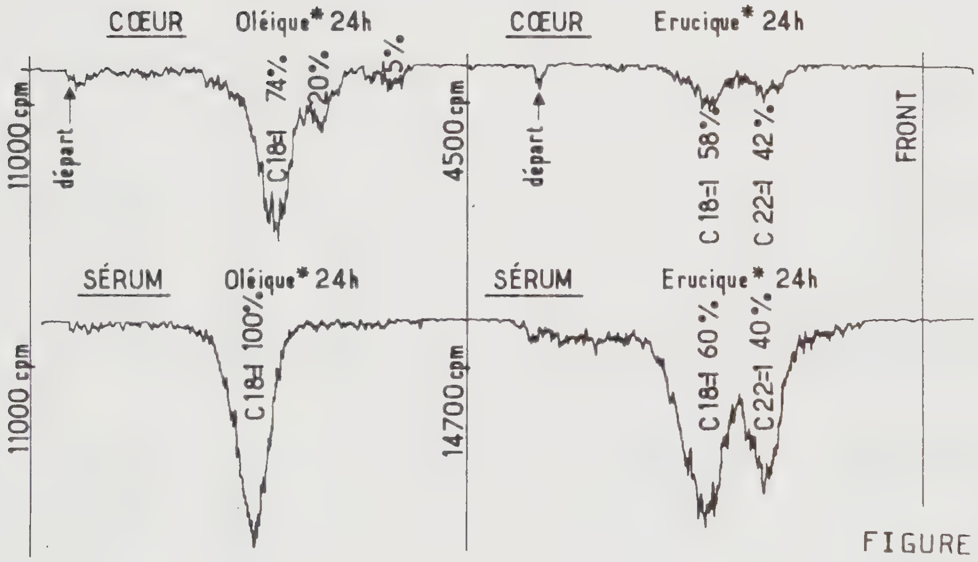


FIGURE 2

TABLEAU X

REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE DANS LES LIPIDES DU SERUM ET DU MYOCARDE (p.100) 24 ET 48 H APRES ADMINISTRATION D'ACIDES GRAS MARQUES (10 µC/RAT)

Acide gras marqué administré	$C_{18} = 1$	$C_{20} = 1$	$C_{22} = 1$	Acides gras saturés
		SERUM		
OLEIQUE [10-^{14}C]				
après 24 h	100	-	-	-
après 48 h	80	-	-	20
ERUCIQUE [14-^{14}C]				
après 24 h	60	-	40	-
après 48 h	90	-	traces	traces
		COEUR		
OLEIQUE [10-^{14}C]				
après 24 h	74	20	-	5
après 48 h	56	35	-	7
ERUCIQUE [14-^{14}C]				
après 24 h	58	-	42	-
après 48 h	55	-	45	-

ENREGISTREMENT DE LA RADIOACTIVITE DES ESTERS METHYLIQUES DES LIPIDES MITOCHONDRIAUX.

(DÜNNSCHICHT SCANNER II BERTHOLD LB 2722).

Plaque de gel de silice + Ag No_3.

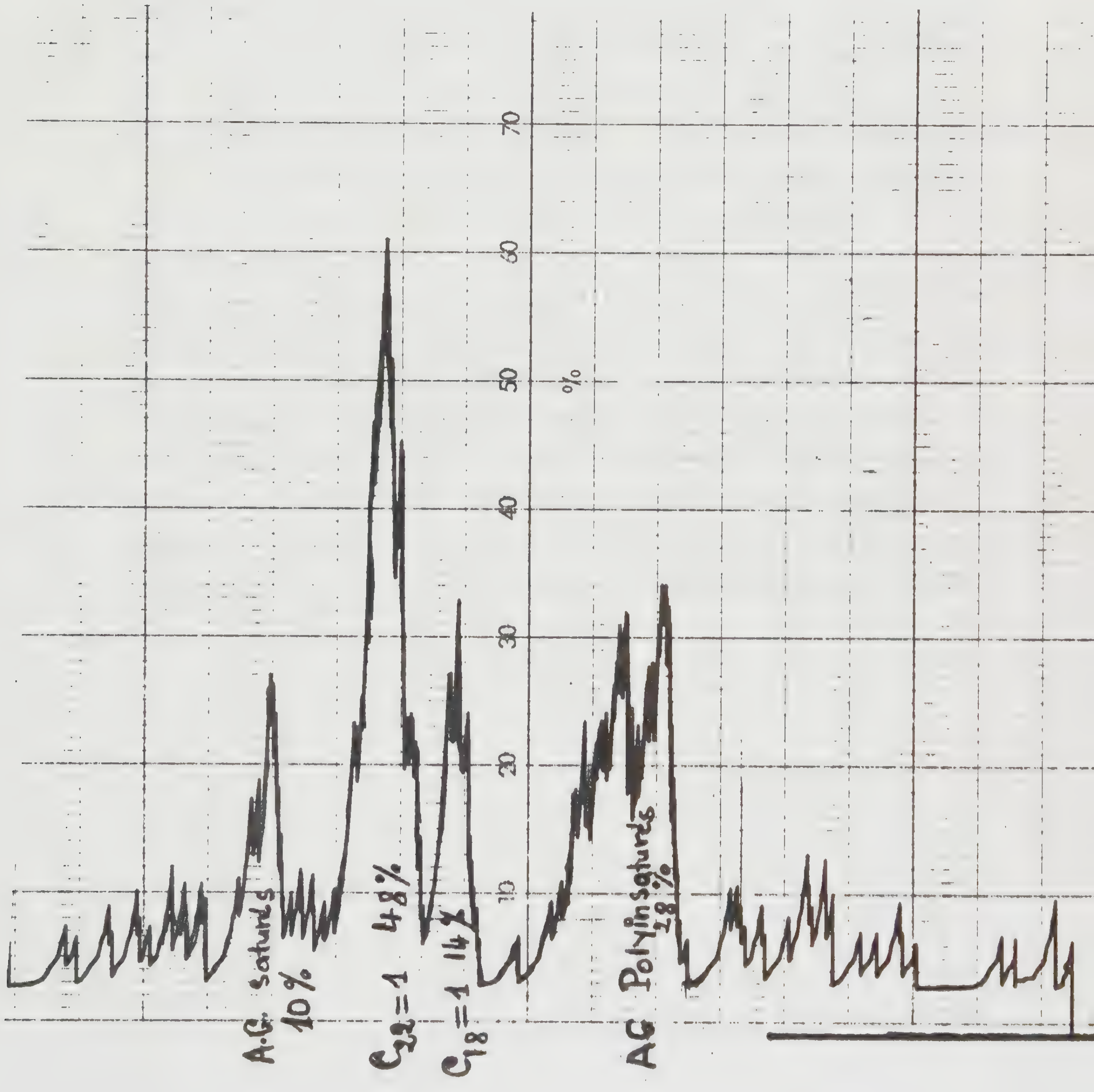


FIGURE 3

L'enregistrement de la radioactivité des lipides des mitochondries obtenues par extraction d'un nombre important de préparations (8 à 10 échantillons réunis après sédimentation à 5 500 g) corrobore et complète les indications fournies par radioscanning des lipides de l'homogénat. L'acide érucique est encore très fortement marqué 72 heures après le début de l'administration d'huile de colza et 4 jours après avoir fourni une dose unique de ER*. Ce pic représente 48 % de la radioactivité totale des lipides et les lipides des mitochondries renferment seulement 14 % d'acide oléique marqué.

En outre, la radioactivité des acides gras polyinsaturés est très forte -observation qui n'apparaissait pas sur le radioscanning des lipides de l'homogénat total de myocarde, leur dilution étant probablement trop élevée. Les conditions adoptées pour la chromatographie gaz-liquide des lipides des homogénats et des mitochondries ne permettent pas de révéler la présence d'acides gras à longue chaîne polyinsaturés. Par contre (tableau XI), deux et trois jours après l'administration quotidienne d'huile de colza, l'acide érucique figure à raison de 4 p.100 dans les lipides de l'homogénat, à raison de 25 p.100 dans ceux des mitochondries du myocarde.

TABLEAU XI

TABLEAU XI

COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES LIPIDES DU MYOCARDE

APRES INGESTION D'HUILE

(p.100 en moles des acides gras totaux)

	C12	C14	C16	C16:1	C18	C18:1	C18:2	C18:3	C20:1	C20:4	C22:
					HOMOGENATS						
OLIVE	-	-	24	-	26	29	16	-	-	5	-
COLZA	-	-	36	-	24	20	11	-	1	4	4
					MITOCHONDRIES						
OLIVE	3	5	21	5	33	13	15	-	-	5	-
COLZA	12	6	12	-	11	15	10	2	5	2	25

D - ACTIVITE ADENYLATE CYCLASE

La détermination de l'activité adénylate cyclase s'effectue en triplicate (avec ou sans fluorure). Chaque série est composée de 3 animaux au sevrage auxquels on fait ingérer pendant 3 jours de suite (par sonde gastrique) 0,5 ou 1 ml d'huile de colza ou d'huile d'olive. Ils sont sacrifiés le 4ème jour.

TABLEAU XII

Ces résultats montrent une activité adénylate cyclase significativement plus faible chez les rats "colza" que chez les rats "olive". (tableau XII).

La diminution de l'activité basale peut provenir d'une inhibition partielle comme d'une quantité plus faible d'enzyme. La mesure de l'activité maximale en présence de fluorure indique qu'il pourrait s'agir d'une diminution du nombre des unités catalytiques adénylate cyclase. Le rapport entre les activités basales des deux séries est identique au rapport entre les activités maximales. L'huile de colza ne semble donc pas agir sur l'activité de chaque unité catalytique.

TABLEAU XII

ACTIVITE ADENYLATE CYCLASE (AC) DU MYOCARDE (pmoles/mn/mg de protéines) APRES INGESTION D'HUILE.

	Colza		Olive		Activité AC coeurs "colza" / Activité AC coeurs "olive"	
NaF	0,5 ml (*)	1 ml (**)	0,5 ml (*)	1 ml (**)	0,5 ml (*)	1 ml (**)
-	24,6 ± 2,7 (3)	32,1 ± 4,0 (3)	37,7 ± 2,5 (3)	45,5 ± 1,1 (3)	0,65	0,72
+	85,3 ± 6,8 (3)	104,3 ± 8,5 (3)	131,6 ± 8,5 (3)	140,4 ± 17,0 (3)	0,64	0,74
Facteur de stimulation...	3,49	3,25	3,46	3,09		

( ) : nombre de rats expérimentés. Dosage en triplicate par animal. Les animaux reçoivent en outre : (*) de la pomme de terre cuite ; (**) un régime lipidoprive semi-synthétique.

D I S C U S S I O N

DISCUSSION

Des observations effectuées au cours de cette étude, certaines -concernant l'oxydation de l'acide érucique- apportent simplement confirmation à nos recherches antérieures (59), et à celles de plusieurs autres laboratoires (11, 63, 85, 86). Il en est ainsi également de l'augmentation de taille du coeur sous l'influence d'un régime riche en huile de colza.

Le travail actuel met l'accent sur plusieurs phénomènes. Il ne semble pas que l'accroissement de la masse cardiaque, quand il existe, persiste au delà du 3ème jour d'expérience chez le rat au sevrage. Dans aucun des lots expérimentés on ne peut faire état de différences significatives entre les poids des coeurs du 4ème et du 7ème jour d'administration d'huile de colza ou d'olive. Il pourrait donc s'agir, en deçà du 4ème jour, d'un afflux d'éléments migrateurs qui accroitraient momentanément la teneur en DNA du myocarde. Cette réaction, 24 à 48 heures après le début de l'ingestion d'huile de colza, pourrait être provoquée par l'arrivée inopinée d'acides gras ou d'autres substances atypiques sur les structures en voie de formation chez le rat au sevrage.

On admet depuis longtemps (27) que la configuration d'un acide gras conditionne sa rapidité d'extraction de la circulation : plus la chaîne hydrocarbonée est longue, plus le myocarde a de difficultés à l'extraire. Toutefois cette interprétation d'expériences déjà classiques ne tient aucun compte du conditionnement biochimique préalable des animaux. Il est pourtant de toute évidence, d'après nos résultats, que la structure des lipides de réserves et celle des lipides membranaires jouent un rôle de premier plan dans l'incorporation des acides gras marqués, dans leur transfert trans-

membranaire notamment au niveau des mitochondries, dans l'équilibre fonctionnel des organelles, au cours des oxydations, etc...

Le coeur du rat nouveau-né ou récemment sevré est encore pauvre en cytochrome-oxydase (69), riche en glycogène, comme durant la vie foetale. Il conserve les propriétés fonctionnelles du muscle lisse et dépend étroitement de la glycolyse. Sa capacité de dégradation des acides gras à longue chaîne est assez faible en raison d'une relativement basse activité acylCoA-carnitine transférase associée à un taux minime de carnitine libre (43). La forte radioactivité des mitochondries "colza" de nos très jeunes animaux ne plaide pourtant pas en faveur d'une difficulté de transfert de OL* ou de ER* vers les sites d'oxydation mais plutôt pour l'hypothèse d'un ralentissement de leur dégradation.

In vitro, la synthèse enzymatique des lipides est bien plus efficace pour l'élongation et la désaturation des acides gras du myocarde que pour la synthèse *de novo* à partir de l'acétate (70,71,72). Ce processus paraît fonctionner parfaitement *in vivo* puisqu'on trouve des acides gras longs polyinsaturés et pratiquement pas d'acides saturés radioactifs dans les mitochondries après administration de ER*. On pourrait croire que la présence de ces acides gras à longue chaîne provoque une inhibition du système oxydatif des mitochondries suivant un processus encore inexpliqué.

Par ailleurs, on sait que le muscle squelettique renferme des lipides en plus ou moins forte proportion et une lipase des triglycérides (73, 74, 75, 76, 77). D'après certains auteurs (78), le muscle cardiaque renfermerait également une lipase hormonosensible qui répondrait au système à double messager (79). Une courte expérience rapportée ici fait pressentir une inhibition non invraisemblable de l'adénylate cyclase du myocarde par les acides gras à longue chaîne des phospholipides membranaires. La

diminution de l'activité de base suggère aussi une réduction de la synthèse endogène des catécholamines. Leur formation (80,81) serait perturbée par un quelconque constituant de l'huile de colza qui s'opposerait aux transferts de substrats entre les sites de synthèse dans la cellule du myocarde. L'hypothèse est d'autant plus plausible qu'une accumulation d'acides gras estérifiés a déjà été observée (82) à la suite de la dénervation sympathique du coeur. Si la déficience de la synthèse endogène de catécholamines peut entraîner une réduction significative de la lipolyse de base par défaut de stimulation de l'adénylate cyclase membranaire, une inactivation de l'enzyme peut aussi provenir d'une élimination des ions Ca^{++} qui forment facilement des complexes insolubles avec l'acide érucique.

C O N C L U S I O N

CONCLUSION

Différents travaux indiquent que l'acide érucique est rapidement converti en acide oléique dans le foie (59) mais qu'il est oxydé lentement dans le muscle squelettique et incomplètement au niveau du myocarde (11, 63). Nous nous sommes alors demandés si cet acide est extrait sélectivement de la circulation par le muscle cardiaque et si ce dernier l'incorpore plus facilement que les autres acides gras.

Nos recherches ont donc porté dans un premier temps sur l'incorporation _in vivo_ de l'acide érucique marqué dans le myocarde du rat au sevrage après qu'on ait administré _per os_ de l'huile de colza (les rats témoins recevant de l'huile d'olive). On établit une comparaison entre l'incorporation de ER^* (Acide $[14-^{14}C]$ érucique) et celle de OL^* (acide $[10-^{14}C]$ oléique). Les résultats présentés ici indiquent clairement que l'incorporation de ER^* comme celle de OL^* dépendent essentiellement du conditionnement biochimique antérieur de l'animal.

Lorsque le rat reçoit de l'_huile de colza par intubation gastrique_ et qu'on lui administre par la même voie 24 heures avant le sacrifice _une dose unique de ER^* en émulsion_, la radioactivité totale du myocarde comme la radioactivité spécifique rapportée aux protéines (RAS) est particulièrement forte vers la 48ème heure d'expérience. Cette RAS élevée concerne les mitochondries et les microsomes. Le cytosol est aussi très radioactif, les noyaux le sont moins (83).

Mesurée dans ces conditions, la radioactivité est une résultante de plusieurs processus, l'incorporation de l'acide gras étant prioritaire alors que la métabolisation et l'oxydation totale ne font que commencer. On peut ainsi admettre que le myocarde du jeune rat est spécialement réceptif à ER* dans les 48 heures qui suivent le début de l'ingestion d'huile de colza. Cette sensibilisation accrue du muscle provient en grande partie à ce stade d'une configuration particulière des phospholipides des membranes en voie d'édification. Cette hypothèse nous a incités à rechercher si l'hypersensibilisation se produit quel que soit l'acide gras radioactif donné en supplément.

En fait, <u>si l'on administre une dose unique de OL* en émulsion 24 heures avant le sacrifice des rats qui ont reçu de l'huile de colza cet acide est aussi fortement incorporé, si ce n'est plus, que ER* et le phénomène ne se produit pas chez le témoin à l'huile d'olive.</u>

Au-delà du 4ème jour d'expérience et jusqu'au 7ème jour, les phénomènes sont inversés :

- le myocarde "colza" saturé d'acide érucique accepte mal ER* en surcharge et le myocarde "olive" saturé d'acide oléïque accepte mal OL* en surcharge - en conséquence, la RAS des coeurs est faible et quasi identique dans ces 2 lots ;

- par contre, la RAS des myocardes "olive + ER*" et "colza + OL*" est considérable.

A ce stade et après administration d'une dose de OL*, la RAS est 2 fois plus forte dans les coeurs "colza" que dans les coeurs "olive" ; elle est 3 fois plus forte après administration d'une dose de ER* dans les coeurs "olive" que dans les coeurs "colza".

Le métabolisme de l'acide érucique a été étudié par radioscanning et par chromatographie gaz-liquide des lipides des homogénats de myocar-

des et dans ceux des mitochondries. Les extractions de lipides sont effectuées 24, 48 et 72 heures après administration d'une dose unique d'acide gras marqué et après ingestion quotidienne d'huile.

Au bout de 24 heures, la moitié de ER^* est déjà convertie en OL^* mais le métabolisme semble stationner à ce stade puisqu'à la 48ème heure le rapport ER^*/OL^* est toujours le même. Au 3ème jour, les lipides des mitochondries sont encore chargés d'acide érucique à raison de 48 p.100 des acides gras totaux. Ils renferment également une assez forte proportion d'acides gras longs qui n'existent qu'à l'état de trace chez les témoins. Ces acides gras longs pourraient être des éléments de perturbation des oxydations mitochondriales puisque le transfert transmembranaire intramitochondrial de ER^* ou de OL^* semble s'effectuer parfaitement.

Une série de déterminations de l'activité adényl cyclase basale et maximale (sous fluorure) indique un effet d'inhibition non invraisemblable des phospholipides membranaires riches en acide érucique et acides gras longs. Si elle se confirme, et nous nous employons actuellement à mettre au point des méthodes encore plus sensibles de déterminations de l'activité adénylate cyclase, cette observation expliquerait une des raisons qui s'opposent à la mobilisation des lipides. L'accumulation d'acides gras estérifiés pourrait être due à une inhibition de la synthèse de catécholamines _in situ_.

Enfin, l'augmentation de poids des coeurs "colza" par rapport aux témoins "olive", décrite par certains auteurs, n'a été retrouvée qu'au 3ème jour d'administration d'huile (rats de 27 jours) et seulement dans une de nos expériences.

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION

I Nature des phénomènes observés 1

II Conditions expérimentales d'obtention du phénomène observé 3

III Mécanismes de la surcharge lipidique 6

PROTOCOLE ET TECHNIQUES EXPERIMENTALES

I Protocole expérimental 12

II Techniques expérimentales 14

RESULTATS

I Incorporation des acides gras marqués au myocarde 25

II Incorporation des acides gras marqués dans les fractions subcellulaires du myocarde 48

III Métabolisme de ER* ou de OC* au niveau du myocarde 51

IV Activité adénylate cyclase 55

DISCUSSION 57

CONCLUSION 60

BIBLIOGRAPHIE 63

B I B L I O G R A P H I E

RECAPITULATION DES REFERENCES PLACEES DANS LE TEXTE SOUS UN NUMERO [illegible] ET DONT LES REFERENCES SONT DONNEES PAR ORDRE ALPHABETIQUE.

1 (THOMASSON), 2 (ROINE), 3 (ROCQUELIN), 4 (ABLELLATIF), 5 (BEARE-ROGERS), 6-7 (ROCQUELIN), 8 (ABDELLATIF), 9 (ROCQUELIN), 10 (INSERM), 11 (HOUTSMULLER), 12 (BEARE-ROGERS), 13 (THOMASSON), 14 (ROCQUELIN), 15-16 (ABDELLATIF), 17 (BEARE-ROGERS), 18 (ABDELLATIF), 19 (BING), 20 (GORDON), 21 ([illegible]), 22 ([illegible]), 23 (WILLEBRANDS), 24 ([illegible]), 25 ([illegible]), 26 ([illegible]), 27-28-29 (EVANS), 30 (WILLEBRANDS), [illegible], 32 (CHALLONER), 33 ([illegible]), 34 (PANDE), [illegible]), 37 ([illegible]), 38 ([illegible]), [illegible], 40 ([illegible]), 41-42 (FRITZ), 43 ([illegible]), 44 (BRESSLER), 45 (SULKIN), 46 (SCHEUER), 47 (FERRANS), 48 (ALEXANDER), 49 (BURCH), 50 (WITTELS), 51 (GARLAND), 52-53 (DENTON), 54-55 (MOSKOWITZ), 56-57 (BEARE - ROGERS), 58 (CRAIG), 59 (CARREAU), 60 (LAPOUS), 61 (BACH), 62 (CHRISTOPHERSEN), 63 (LEMARCHAL), 64 (LOWRY), 65 (FOLCH), 66 (LOURY), 67 (SKIDMORE), 68 (CHASE), 69 (DEHAAN), 70 (CHRIST), 71 (HULSMANN), 72 (WHEREAT), 73 (WIRSEN), 74-75-76 (GEORGE), 77 (BILINSKI), 78 (RIZACK), 79 (BUTCHER), 80 (CHIDSEY), 81 (WURTMAN), 82 (WELCH), 83 (KETEVI), 84 (STRUIJK), 85 (BOUCROT), 86 (ROCQUELIN), 87 (de VRIES).

B I B L I O G R A P H I E

ABDELLATIF, A.M.M., VLES, R.O.
Pathological effects of dietary rapeseed oil in rats.
Nutr. Metabol. 1970, 12 : 285-295 (8)*.

ABDELLATIF, A.M.M., VLES, R.O.
Physiopathological effects of rapeseed oil and canbra oil in rats.
Proceedings of the international conference on the Science, Technology and Marketing of rapeseed and rapeseed products.
Ste. Adèle, Quebec, September 20-23, 1970, p. 423-434 (4).

ABDELLATIF, A.M.M., VLES, R.O.
Pathological effects of dictary rapeseed oil in ducklings.
Nutr. Metabol., 1970, 12 : 296-305 (16).

ABDELLATIF, A.M.M., VLES, R.O.
The effects of various fat supplements on nutritional and pathogenic characteristics of diets containing erucic in ducklings.
Nutr. Metabol., 1971, 13 : 65-74 (15).

ABDELLATIF, A.M.M., VLES, R.O.
Long term pathological effects of dietary rapeseed oils in rats and rabbits.
Unilever Research (Vlaardingen.) Rep. 1971 (18)

* ( ) Numéro de la référence.

ALEXANDER, C.S.
Electron microscopic observations in alcoholic heart disease.
Brit. Heart. J., 1967, 29 : 200 - 206 (48).

BACH, A., METAIS, P., RAULIN, J., JACQUOT, R.
Métabolisme de l'acide érucique : II-Vitesse d'oxydation.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1969, 51 : 167-175 (61).

BALLARD, F.B., DANFORTH, W.H., NAEGLE, S., BING, R.J.
Myocardial metabolism of fatty acids.
J. Clin. Invest., 1960, 39 : 717-723 (22).

BEARE, J.C., CAMPBELL, J.A., YOUNGS, C.G., CRAIG, B.M.
Effects of saturated fat in rats fed rapeseed oil.
Can. J. Biochem. Physiol., 1963 41 : 605-612 (57).

BEARE-ROGERS, J.L., NERA, E.A., HEGGTVEIT, H.A.
Cardiac lipid changes in rat fed oils containing long-chain fatty acids.
Can. Inst. Food. Tech. J., 1971, 4 : 120-124 (12).

BEARE-ROGERS, J.L.
Nutritional aspects of long chain fatty acids.
Proceedings of the international conference on the Science, Technology and Marketing of rapeseed and rapeseed products.
Ste. Adèle, Quebec, September 20-23 1970, p. 450-465 (5).

BEARE-ROGERS, J.L., NERA, E.A., CRAIG, B.M.
Accumulation of cardiac fatty acids in rats fed synthesized oils containing C_{22} fatty acids.
Lipids, 1972, 7 : 46-50 (56).

BEARE-ROGERS, J.L., NERA, E.A.

Cardiac fatty acids and histopathology of rats,pigs, monkeys and gerbils fed rapeseed oil.

Comp. Biochem. Physiol., 1972 , 41 B : 793-800 (17).

BILINSKI, E.

Utilization of lipids by fish.

Fatty acid oxidation by tissue slices from dark and white muscle rainbow trout (Salma Gairdner).

Can. J. Biochem., 1963, 41 : 107-112 (77).

BING, R.J.

The metabolism of the heart.

Harvey Lect., 1954, 50 : 27-70 (19).

BREMER, J.

Carnitine in intermediary metabolism. The biosynthesis of palmitylcarnitine by cell subfractions.

J. Biol. Chem., 1963 , 238 : 2774-2779 (39).

BREMER, J.

Factors influencing the carnitine dependent oxidation of fatty acids : "Cellular compartimentalization and control of fatty acid metabolism".

Universited-Forlaget Oslo, 1968, . 65-88 (40).

BRESSLER, R., WITTELS, B.

The effects of diphteria toxin on carnitine metabolism on the heart.

Biochim. Biophys. Acta., 1965, 104 : 39-45 (44).

BURCH, G.E., DE PASQUALE, N.P.

Alcoholic cardiomyopathy.

Am. J. Cardiol., 1969, 23 : 723-731 (49).

BUTCHER, R.W., ROBISON, G.A., HARDMAN, J.D., SUTHERLAND, E.W.
Advances in Enzyme Regulation
Pergamon Press, 1968, 6 : 357-389 (79).

CARREAU, J.P., THORON, A., LAPOUS, D., RAULIN, J.
Métabolisme de l'acide érucique : I - Conversion en acide oléique.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, : 1973-1980 (59).

CARLSTEN, A., HALLGREN, B., JAGENBURG, R., SVANBORG, A., WERKO, L.,
Myocardial arteriovenous differences of individual free fatty acid in healthy human individuals.
Metabolism, 1963, 12 : 1063-1071 (21).

CARLSTEN, A., HALLGREN, B., JAGENBURG, R., SVANBORG, A., VERKO, L.,
Myocardial metabolism of glucose, lactic acid, amino-acids and fatty acids in healthy human individuals at rest and at different work loads.
Scandinav. J. Clin. Lab. Invest., 1961, 13 : 418-428 (24).

CHALICNER, D.R., STEINBERG, D.,
The effect of free fatty acid on the oxygen consumption of the perfused rat heart.
Am. J. Physiol., 1966, 210 : 280-286 (32).

CHASE, L.R., AURBACH, G.D.,
Renal adenyl-cyclase : anatomically separate sites for PTH and Vasopressine.
Science, 1968, 159 : 545-547 (68).

BOUCROT, P., BEZARD, J.
Incorporation et transformations métaboliques de l'acide érucique ^{14}C in vivo dans les lipides de plusieurs organes et tissus de Rats soumis à un régime à base d'huile de colza, ou de canbra, ou d'arachide.
Arch. Sci. Physiol., 1973, 27 : 1-24 (85).

CHIDSEY, C.A., KAISER, G.A., BRAUNWALD, E.,
Biosynthesis of norepinephrine in isolated canine heart.
Science, 1963, 139 : 828-829 (80).

CHRIST, E.J., HULSMANN, W.C.
Synthesis of long-chain fatty acids by mitochondrial enzymes.
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 60 : 72-79 (70).

CHRISTOPHERSEN, B.O., BREMER, J.
Erucic acid - an inhibitor of fatty acid oxidation in the heart.
Biochim. Biophys. Acta, 1972, 280 : 506-514 (62).

CRAIG, B.M., YOUNGS, C.G., BEARE, J.L., CAMPBELL, J.A.
Fatty acid composition and glyceride structure in rats fed rapeseed oil or corn oil.
Can. J. Biochem. Physiol., 1963, 41 : 43-49 (58).

DEHAAN, R.L.
Differentiation of the atrioventricular conducting system of the heart.
Circulation, 1961, 24 : 458-470 (69).

DELCHER, H.K., FRIED, M., SHIPP, J.C.
Metabolism of lipoprotein lipid in the isolated perfused rat heart.
Biochim. Biophys. Acta, 1965, 106 : 10-18 (25).

DENTON, R.M., RANDLE, P.J.
Measurement of flow of carbon atoms from glucose and glycogen glucose to glyceride glycerol and glycerol in rat heart and epididymal adipose tissue. Effects of insulin, adrenalin and alloxan diabetes.
Biochem. J., 1967, 104 : 423-434 (52).

DENTON, R.M., RANDLE, P.J.

Concentration of glycerides and phospholipids in rat heart and gastrocnemius muscles. Effects of alloxan-diabetes and perfusion.

Biochem. J., 1967, 104 : 416-422 (55).

EVANS, J.R.

Cellular transport of long-chain fatty acids.

Can. J. Biochem., 1964, 42 : 955-969 (29).

EVANS, J.R.

Importance of fatty acid metabolism in myocardial metabolism.

Circulation research., 1964, suppl. II, 14

96-108 (27).

EVANS, J.R., OPIE, L.H., SHIPP, J.C.

Metabolism of palmitic acid in perfused rat heart.

Am. J. Physiol., 1963, 205 : 766-770 (28).

FERRANS, V.J., HIBBS, R.G., WEILBAECHER, D.G., BLACK, W.C. WALSH, J.J., BURCH, G.E.

Alcoholic cardiomyopathy.

Am. Heart. J., 1965, 69 : 748-765 (47).

FOLCH, J., LEES, M., SLOANE STANLEY, G.H.

A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.

J. Biol. Chem., 1957, 226 : 497-509 (65).

FRIEDBERG, S.J., BRESSLER, R.

The formation and isolation of long-chain acyl carnitines in mitochondria.

Biochim. Biophys. Acta, 1965, 98 : 335-343 (37).

FRITZ, I.B., YUE, K.T.N.
Long-chain carnitine acyl transferase and the role of acylcarnitine derivatives in the catalytic increase of fatty acid oxidation induced by carnitine.
J. Lipid. Res., 1963, 4 : 279-288 (36).

FRITZ, I.B.
Carnitine and its role in fatty acid metabolism.
Advances Lipid. Res., 1963, 1 : 286-334 (38).

FRITZ, I.B.,
Carnitine effects on palmitate [1-^{14}C] conversion to CO_2 and glycerides by various tissues.
Am. J. Physiol., 1964, 206 : 1217-1222 (42).

FRITZ, I.B., KAPLAN, E., YUE, K.T.N.
Specificity of carnitine action on fatty oxydation by heart muscle.
Am. J. Physiol., 1962, 202 : 117-121 (41).

GARLAND, P.B., RANDLE, P.J.
Regulation of glucose uptake by muscle: 10 Effects of alloxan-diabetes, starvation hypophysectomy and adrenalectomy, and of fatty acids, ketone bodies and pyruvate on the glycerol output and concentrations of free fatty acids, long chain fatty acyl CoA, glycerol phosphate and citrate-cycle intermediates in rat heart and diaphragm muscles.
Biochem. J., 1964, 93 : 678-687 (51).

GEORGE, J.C., JVOTI, D.
Histological features of the breast and leg muscles of bird and bat and their physiological evolutionary significance.
J. Anim. Morphol. Physiol., 1955, 2 : 31-36 (74).

GEORGE, J.C., NAIK, R.M.
Relative distribution and chemical nature of the fuel store of the two types of fibres in the pectoralis major muscle of the pigeon .
Nature, 1958, 181 : 709-711 (76).

GEORGE, J.C., SCARIA, K.S.
Histochemical demonstration of lipase activity in the pectoralis major muscle of the pigeon.
Nature, 1958, 181 : 783 (75).

GORDON, R.S. Jr., CHERKES, A.
Unesterified fatty acid in human blood plasma.
J. Clin. Invest., 1956, 35 : 206-212 (20).

HOUTSMULLER, U.M.T., STRUIJK, C.B., Van Der BEEK, A.
Decrease in rate ATP synthesis of isolated rat heart mitochondria induced by dietary erucic acid.
Biochim. Biophys. Acta, 1970, 218, : 564-566 (11).

HULSMANN, W.C.
On the synthesis of malonyl-coenzyme A in rabbit-heart sarcosomes.
Biochim. Biophys. Acta, 1966, 125 : 398-400 (71).

I.N.S.E.R.M.
Compte Rendu de la réunion des contractants de l'ATP 6 de l'INSERM, 22 Mai 1973 (10).

KETEVI, P., LAPOUS, D., LORIETTE, C.
Huile de colza marquée et radioactivité des éléments subcellulaires du myocarde.
J. Physiol., 1973, 67 : 200-201 A (83).

LAPOUS, D., CARREAU, J.P., RAULIN, J.
Métabolisme de l'acide érucique : III Sort de l'acide érucique 14-^{14}C dans différents organes et fractions subcellulaires du Rat.
Arch. Sc. Physiol., 1970, 24 : 125-131 (60).

LEMARCHAL, P., CLOUET, P., BLOND, J.P.
β oxydations comparées des acides érucique et oléique par les mitochondries de coeur de Rat in vitro.
C.R. Acad. Sci., 1972, 274 : 1961-1963 (63).

LOURY, M.
Une méthode générale permettant la transformation rapide des corps gras en esters méthyliques.
Rev. Fse. Corps Gras, 1967, 6 : 383-386 (66).

LOWRY, Q.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 1951, 193 : 265-275 (64).

MARQUIS, N.R., FRITZ, I.B.
Enzymological determination of free carnitine concentrations in rat tissues.
J. Lipid. Res., 1954, 5 : 184-187 (35).

MOSKOWITZ, J., HARWOOD, J.P., FORN, J., KRISHNA, G., RODGERS, B., MORROW, A.,
Effect of noradrenaline and prostaglandin E_1, on adenosine 3',5'-monophosphate formation in isolated pericardial fat cells of man.
Nat. New Biol., 1971, 230 : 214-215 (54).

MOSKOWITZ, J., FAIN, J.N.
Hormonal regulation of lipolysis and phosphorylase activity in human fat cells.
J. Clin. Invest., 1969, 48 : 1802-1808 (55).

OLSON, R.E.

Effects of pyruvate and acetoacetate on the metabolism of fatty acids by the perfused rat heart.
Nature, 1962, 195 : 597-599 (31).

PANDE, S.V., HEAD, J.F.
Distribution of long-chain fatty acid activating enzymes in rat tissues.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 152 : 636-638 (34).

RIZACK, M.A.
Activation of an epinephrinesensitive lipolytic activity from adipose tissue by adenosine 3',5'-phosphate.
J. Biol. Chem., 1964, 239 : 392 -395 (78).

ROCQUELIN, G., CLUZAN, R.
L'huile de colza riche en acide érucique et l'huile de colza sans acide érucique. Valeur nutritionnelle et effets physiologiques chez le rat.
I) Effets sur la croissance, l'efficacité alimentaire et l'état des différents organes.
Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 1968, 8 : 395-406 (3).

ROCQUELIN, G., SIERGEL, J.P., MARTIN, B., LECLERC, J., CLUZAN, R.
The nutritive value of refined rapeseed oils.
J. Am. Oil. Chem. Soc. 1971, 48 : 728-732 (6).

ROCQUELIN, G.
L'huile de colza et l'huile de canbra : effets à très court terme sur les lipides cardiaques et hépatiques du rat sevré.
C.R. Acad. Sci., 1972, 274 : 592-595 (7).

ROCQUELIN, G., CLUZAN, R., LECLERC, J.
Communication présentée au VIIIe Congrès International de Nutrition, Prague 1969 (9).

ROCQUELIN, G., MARTIN, B., CLUZAN, R.
Comparative physiological effects of rapeseed and canbra oils in the rat : influence of the ratio of saturated to monounsaturated fatty acids.
Proc. of the International Conference on the Science, Technology and Marketing of rapeseed and rapeseed products. Ste. Adèle, Québec, September 20-23, 1970, p. 405-422 (14).

ROCQUELIN, G., CLUZAN, R., VODOVAR, ., LEVILLAIN, R.
Recherches récentes sur les effets physiopathologiques des huiles de colza et de canbra au niveau du myocarde et d'autres organes.
Cah. Nutr. Diet., 1973, 8, 103-116 (86).

ROINE, P., UKSILA, E., TEIR, H., RAPOLA, J.
Histopathological changes in rats and pigs fed rapeseed oil.
Z. Ernährungsw., 1960, 1 : 118-124 (2).

SCHEUER, J., OLSON, R.I.
Metabolism of exogenous triglycerides by the isolated perfused rat heart.
Am. J. Physiol., 1967, 212 2 : 301-307 (33).

SCHEUER, J., BRACHFELD, N.
Myocardial uptake and fractional distribution of palmitate 1-^{14}C by ischemic dog heart.
Metabolism, 1966, 15 : 945-954 (46).

SKIDMORE, W.D., ENTENMAN, C.
The determination of esterified fatty acids in glycerides, cholesterol esters, and phosphatides.
J. Lipid. Res., 1962, 3 : 356-363 (67).

STEIN, Y., STEIN, O.
Uptake of serum 32P-lysolecithin by the isolated perfused rat heart.
Life Sci., 1964, 3 : 883-884 (26).

STRUIJK, C.B., HOUTSMULLER, U.M.T., JANSEN, H., HULSMANN, W.C.
Increase in postheparin lipoprotein lipase activity in rat plasma by dietary erucic acid.
Biochim. Biophys. Acta, 1973, 296 : 253-256 (84).

SULKIN, N.M., SULKIN, D.F.
An electron microscopic study of the effects of chronic hypoxia on cardiac muscle, hepatic and autonomic ganglion cells.
Laboratory Invest., 1965, 14 : 1523-1546 (45).

THOMASSON, H.J.
The biological value of oils and fats. Growth and food intake on feeding with natural oils and fats.
J. Nutr., 1955, 56 : 455-468 (1).

THOMASSON, H.J., GOTTENBOS, J.J., Van PIJPEN, P.L., VLES, R.O.
Nutritive value of rapeseed oil.
Int. Symp. Chem. Technol. Rapeseed oil and other Cruciferae oils.
Gdansk, Pologne 1970, 381-402 (13).

WELCH, C.H.Jr., BRAUNWALD, E., CASE, R.B., SARNOFF, S.J.
The effect of mephentermine sulphate on myocardial oxygen consumption, myocardial efficiency and peripheral vascular resistance.
Am. J. Med., 1958, 24 : 871-881 (82).

VRIES(de), B., JURRIENS, G.
Trennung von lipiden mittels Dünnschicht-chromatographie auf Silbermtrat imprägnierten Kieselgel
Fette, Seifen, Anstrich., 1963, 65 : 725-727 (87).

WHEREAT, A.F., HULL, F.E., ORISHIMO, M.W., RABINOWITZ, J.L.
The role of succinate in the regulation of fatty acid synthesis by heart mitochondria.
J. Biol. Chem., 1967, 242 : 4013- 4022 (72).

WILLEBRANDS, A.F.
Myocardial extraction of individual non-esterified fatty acids, esterified fatty acids and aceto-acetate in the fasting human.
Clin. Chim. Acta, 1964, 10 : 435-446 (30).

WILLEBRANDS, A.F.
Utilization of individual non-esterified fatty acids by the isolated perfused rat heart.
Biochim. Biophys. Acta, 1964, 84 : 607-610 (23).

WIRSEN, C.
Studies in lipid mobilization.
Acta physiol. Scandinav., 1965, 65 Suppl. 252, 1-46 (73).

WITTELS, B., BRESSLER, R.
Lipid metabolism in the newborn heart.
J. Clin. Invest., 1965, 44 : 1639-1646 (43).

WITTELS, B., BRESSLER, R.
Biochemical lesion of diphteria toxin in the heart.
J. Clin. Invest, 1964, 43 : 630-637 (50).

WURTMAN, R.J.
Catecholamines.
New England J. Med., 1965, 273 : 637-746 (81).